

Identifizierung von Pflanzensignalen, die  
Differenzierung von *Ustilago maydis* auf der  
Blattoberfläche induzieren



**DISSERTATION**  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

Dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Patrick Berndt**  
aus Dierdorf

Marburg/Lahn, 2009

Identifizierung von Pflanzensignalen, die  
Differenzierung von *Ustilago maydis* auf der  
Blattoberfläche induzieren

**DISSERTATION**

zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

Dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Patrick Berndt**  
aus Dierdorf

Marburg/Lahn, 2009

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Anfang März 2006 bis Februar 2009 unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. Regine Kahmann in Marburg am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in der Abteilung Organismische Interaktionen durchgeführt.

Vom Fachbereich  
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation  
angenommen am: 23.06.2009

Erstgutachter:        Frau Prof. Dr. Regine Kahmann  
Zweitgutachter:      Herr Prof. Dr. Hans-Ulrich Mösch

Tag der mündlichen Prüfung: 16.07.2009

## Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

„Identifizierung von Pflanzensignalen, die zur Differenzierung von *Ustilago maydis* auf der Blattoberfläche führen“

selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfsmittel bedient habe.

Diese Dissertation wurde in der jetzigen oder eine ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 20.05.2009

Patrick Berndt

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

**MENDOZA-MENDOZA A.\*, BERNDT P.\*, DJAMEI A., WEISE C., LINNE U., MARAHIEL M., VRANEŠ M., KÄMPER J. AND KAHMANN R. (2009A)** Physical-chemical plant-derived signals induce differentiation in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* **71(4)**:895-911.

\*:Autoren trugen zu gleichen Teilen zu der Arbeit bei.

## Zusammenfassung

Das Maispathogen *Ustilago maydis* kann nach Fusion zweier haploider Zellen kompatiblen Paarungstyps seine pathogene Entwicklung initiieren und ein Dikaryon bilden. Die Zell-Zell Erkennung beruht auf einem Pheromon/Rezeptor System. Das Pheromon-Signal wird durch ein MAP-Kinase Modul übertragen, was zur Aktivierung von Prf1 führt, einem essentiellen Regulator von sexueller und pathogener Entwicklung. Auf der Oberfläche von *Zea mays* wächst das Dikaryon filamentös, differenziert ein Appressorium und penetriert die Wirtspflanze.

In dieser Arbeit wurden die Pflanzensignale, die für Filamentbildung und Differenzierung von Appressorien benötigt werden, charakterisiert. Mittels eines solopathogenen Stammes konnte gezeigt werden, dass unter *in vitro* Bedingungen Hydroxy-Fettsäuren die Filamentbildung durch Induktion der Pheromon-Genexpression stimulierten. Dieses Signal aktiviert das MAP-Kinase Modul. Die beobachteten Filamente waren morphologisch ununterscheidbar Konjugationshyphen. Kontakt zu einer hydrophoben Oberfläche induzierte ebenfalls Filamentbildung und diese Filamente ähnelten dem filamentösen Dikaryon auf der Blattoberfläche. Es konnte gezeigt werden, dass die Integration beider Pflanzensignale das MAP-Kinase Modul, die Anwesenheit der MAPK Crk1 sowie des Transkriptionsfaktors Prf1 voraussetzt. Mit Hilfe eines Markergens, das spezifisch in der Spitzenzelle von Filamenten exprimiert wird, die ein Appressorium differenzieren, konnte gezeigt werden, dass Hydrophobizität *in vitro* essentiell für die Appressorienbildung war. Hydroxy-Fettsäuren wirkten auf hydrophober Oberfläche induzierend auf die Frequenz der Appressorienbildung. Diese Ergebnisse zeigen, dass die frühe Phase der Kommunikation zwischen *U. maydis* und seiner Wirtspflanze Mais über Integration von zwei distinkten Stimuli erfolgt.

Um zu untersuchen, welche Gene nach Kontakt mit hydrophober Oberfläche und Hydroxy-Fettsäure induziert werden, wurden Transkriptom-Analysen mittels des *in vitro* Systems durchgeführt. Ein signifikanter Anteil der induzierten Gene kodierte für putativ sekretierte Proteine, darunter einige mit Funktionen in der pilzlichen Zellwandmodifikation, Komponenten der Zellwand, Proteine mit enzymatischer Funktion und Proteine ohne Homologie zu bekannten Proteinen. Letztere stellen möglicherweise Effektoren für die Interaktion mit dem Wirt dar. Diese Ergebnisse zeigen, dass bereits während der pilzlichen Entwicklung auf der Pflanzenoberfläche ein molekularer Dialog zwischen *U. maydis* und seinem Wirt initiiert wird.

## Summary

After fusion of two haploid cells of compatible mating type, the smut fungus *Ustilago maydis* forms a dikaryon and initiates its pathogenic development. The cell-cell recognition is based on a pheromone/receptor system. The pheromone signal is transmitted via a MAP kinase modul, leading to the activation of Prf1, an essential regulator of sexual and pathogenic development. On the surface of *Zea mays*, the dikaryon switches to filamentous growth, differentiates an appressorium and penetrates the host.

In this thesis the plant signals required for filament formation and appressorium development in *U. maydis* were characterized. Using a solopathogenic strain that is able differentiate without a mating partner, we show that hydroxy-fatty acids stimulate filament formation under *in vitro* conditions by induction of pheromone gene expression. This leads to the activation of the MAP-kinase module. These filaments were morphologically indistinguishable from conjugation tubes. Hydrophobicity also induced formation of filaments and these resemble the dikaryotic filaments formed on the plant surface. The integration of both plant derived stimuli was dependent on the MAP kinase modul, the presence of the MAPK Crk1 and the transcription factor Prf1. With the help of a marker gene that is specifically expressed in the tip cell of hyphae forming appressoria, it was shown that hydrophobicity *in vitro* is essential for appressorium formation. Hydroxy-fatty acids on the hydrophobic surface had an enhancing effect on the rate of appressorium formation. These results show that the early phase of communication between *U. maydis* and its host plant maize involves the integration of two distinct stimuli.

To obtain insight into which genes were induced after exposure to hydrophobicity and hydroxy-fatty acids, a transcriptome analysis was performed using the *in vitro* system. A significant share of the induced genes coded for putative secreted proteins, among those were proteins with a role in fungal cell wall modification, components of the cell wall, proteins with enzymatic function and proteins without homology to known proteins in the databases. The latter proteins resembled putative effectors for the interaction with the host. This indicates that already during the development on the plant surface a molecular dialog between *U. maydis* and its host is initiated.

## Abkürzungen und Fachbegriffe

aa	Aminosäuren	MOPS	3-(N-Morpholino)propan-sulphonat
Abb.	Abbildung	mRNA	“messenger-RNA”
AM	„ammonium minimal medium“	N-	aminoterminal
Amp	Ampicillin	terminal	
bbs	„b-binding site“	Nat	Nourseothricin
bp	Basenpaar(e)	NM	„nitrate minimal medium“
BLAST	„basic local alignment search tool“	OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
bzw.	beziehungsweise	ORF	Offener Leserahmen
cAMP	„cyclic adenosine monophosphate“	PCR	„polymerase chain reaction“
Cbx	Carboxin	PD	„potato dextrose“
CM	„complete medium“	PEG	Polyethylenglycol
Δ	Deletion	Phleo	Phleomycin
d. h.	das heißt	PKA	Protein Kinase A
DAPI	4',6'-Diamino-2-Phenylindol	RNA	Ribonukleinsäure
DIC	„differential interference contrast“	RR	„response regulator“
DMSO	Dimethylsulfoxid	RT	Raumtemperatur
DNA	Desoxyribonukleinsäure	SDS	Natriumdodecylsulfat
dpi	„days post infection“	sec	Sekunde(n)
DTT	Dithiothreitol	TAE	Tris-Acetat + Na <sub>2</sub> -EDTA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	TBE	Tris-Borat + Na <sub>2</sub> -EDTA
f. c.	„final concentration“	TE	Tris-HCl + Na <sub>2</sub> -EDTA
eGFP	„enhanced green fluorescent protein“	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylen-diamin
EtOH	Ethanol	Tris	Trishydroxymethyl-aminomethan
h	Stunde(n)	U	Unit (Einheit für Enzymaktivität)
H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub>	zweifach destilliertes Wasser	UAS	„upstream activating sequence“
HMG	„high mobility group“	Upm	Umdrehungen pro Minute
Hyg	Hygromycin	UV	ultraviolettes Licht
kb	Kilo Basenpaar(e)	WGA	„wheat germ agglutinin“
MAPK	„mitogen-activated protein kinase“	X-gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid
MAPKK	MAPK-Kinase	YEPS	„yeast extract peptone sucrose“-Medium
MAPKKK	MAPKK-Kinase		
min	Minute(n)		

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Das Pathogen <i>Ustilago maydis</i>	1
1.2	Der Lebenszyklus von <i>U. maydis</i>	3
1.3	Die Signaltransduktion während der frühen Phase der pathogenen Entwicklung	7
1.4	Pathogenitätsrelevante Signaltransduktion in anderen pflanzenpathogenen Pilzen	11
1.5	Die frühe Pilz- Pflanze Interaktion	12
1.6	Fragestellung der Arbeit	15
<b>2</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>16</b>
2.1	Chemische Signale induzieren distinkte morphologische Differenzierung	16
2.2	Hydroxy-Fettsäuren aktivieren die Pheromon-abhängige Signaltransduktion	19
2.3	Kontakt zu hydrophoben Oberflächen induziert die Bildung von septierten Filamenten	21
2.4	Eine Kombination aus chemischen Signalen und hydrophober Oberfläche induziert effiziente Appressorienbildung in <i>U. maydis</i>	23
2.5	Die Pheromon-aktivierbaren MAPK Kaskade ist essentiell für die morphologische Antwort auf Hydroxy-Fettsäuren und Hydrophobizität	28
2.6	Hydroxy-Fettsäuren induzieren eine Phosphorylierung der MAP-Kinase Hog1	32
2.7	Aktivierung der <i>b</i> -abhängigen Genexpression ist nicht ausreichend für die Appressorienbildung	33
2.8	Exogenes cAMP inhibiert Filament- und Appressorienbildung <i>in vitro</i>	34
2.9	Hydrophobizität und Hydroxy-Fettsäuren induzieren die Expression des Transkriptionsfaktors <i>prf1</i>	35
2.10	Das UAS-Element spielt nur im solopathogenen Stamm SG200 eine Rolle in der Kontrolle der pathogenen Differenzierung	37
2.11	Hydrophobizität bewirkt Expression von <i>prf1</i> in Abwesenheit des Transkriptionsfaktors <i>rop1</i>	42
2.12	Differentielle Genexpression in SG200AM1 als Antwort auf Hydrophobizität und Hydroxy-Fettsäurestimulus	47
2.13	Die Expression von Genen des primären Kohlenstoff-Metabolismus wird durch Hydrophobizität und Fettsäure-Stimulus reprimiert	49
2.14	Die Expression von putativ sekretierten Proteinen wird durch Hydrophobizität und Fettsäurestimulus erhöht	51



<b>3</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>54</b>
3.1	Hydroxy-Fettsäuren induzieren pheromonabhängige Filamentbildung in <i>U. maydis</i> .	54
3.2	Die Perzeption von induzierenden Hydroxy-Fettsäuren könnte über G-Protein gekoppelte Rezeptoren erfolgen	57
3.3	Der Kontakt zu hydrophoben Oberflächen induziert pathogene Differenzierung in <i>U. maydis</i>	58
3.4	Die Wahrnehmung der induktiven Oberfläche könnte durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Pilz und Oberfläche vermittelt werden	58
3.5	Die Anwesenheit von Hydroxy-Fettsäuren führt auf hydrophober Oberfläche zur effizienten Bildung von Appressorien	60
3.6	Die Signalkomponenten für Weiterleitung der pflanzlichen Stimuli	61
3.6.1	Die Pheromon-abhängige MAPK ist essentiell für die pathogene Differenzierung	62
3.6.2	Aktivierung des cAMP-Weges inhibiert Filament- und Appressorienbildung	63
3.6.3	Das Zusammenspiel von MAPK- und cAMP- abhängiger Signaltransduktion reguliert die Expression von <i>prf1</i>	64
3.6.4	Die Expression von <i>prf1</i> unterliegt einer komplexen Regulation	65
3.6.5	Unterschiede und Gemeinsamkeiten von <i>U. maydis</i> mit anderen pilzlichen Pathogenen in den pathogenitätsrelevanten Signal-Komponenten	66
3.7	Die frühe transkriptionelle Antwort von <i>U. maydis</i> auf Hydrophobizität und Hydroxy-Fettsäuren	68
3.7.1	Hydrophobizität und Hydroxy-Fettsäuren führen zu einer Repression von Genen des Kohlenstoff-Metabolismus	69
3.7.2	Hydrophobizität und Hydroxy-Fettsäuren induzieren fünf verschiedene Klassen von Genen, die für sekretierte Proteine codieren	70
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>75</b>
4.1	Material und Bezugsquellen	75
4.1.1	Medien, Lösungen, Enzyme und Kits	75
4.2	Stämme, Oligonukleotide und Vektoren	77
4.2.1	<i>E. coli</i> -Stämme	77
4.2.2	Maisvarietäten ( <i>Zea mays</i> spec.)	77
4.2.3	<i>U. maydis</i> -Stämme	77
4.2.4	Oligonukleotide	79
4.2.5	Plasmide und Plasmidkonstruktionen	80
4.2.6	Ausgangsplasmide	80
4.2.7	Spezielle Vektoren für das Arbeiten in/mit <i>U. maydis</i>	80
4.2.8	In dieser Arbeit hergestellte Plasmide	81
4.3	Mikrobiologische und zellbiologische Methoden	81
4.3.1	<i>Escherichia coli</i>	81
4.3.2	<i>Zea mays</i>	82
4.3.3	<i>Ustilago maydis</i>	83
4.3.4	Mikroskopie und Bildverarbeitung	86
4.3.5	Bestimmung des Kontaktwinkels von Oberflächen	86
4.4	Molekularbiologische Standard-Methoden	87
4.4.1	Isolierung von Nukleinsäuren	87
4.4.2	<i>In vitro</i> Modifikation von Nukleinsäuren	89
4.4.3	Biochemische Methoden	91

4.4.4	Sequenz- und Strukturanalyse	93
4.4.5	PCR-Techniken	93
4.4.6	Transkriptom-Analyse	94
<b>5</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>99</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG</b>	<b>113</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Pathogen *Ustilago maydis*

*Ustilago maydis* gehört zu der Klasse der Heterobasidiomyceten, Ordnung *Ustilaginales* und der Familie der *Ustilaginaceae*. Die Basidiomyceten beinhalten zwei weit verbreitete Gruppen pflanzenpathogener Pilze: Die Rost- sowie Brandpilze. Sie lösen Symptome an ihren Wirtspflanzen aus, die den Pflanzen ein verrostetes bzw. verbranntes Aussehen verleihen. Bis heute sind etwa 1500 [AGRIOS, 2005] verschiedene Spezies von Brandpilzen bekannt, die eine große Zahl verschiedener ein- und zweikeimblättriger Pflanzen befallen und teilweise erhebliche wirtschaftliche Schäden verursachen. Unter den Wirtspflanzen der Brandpilze befinden sich auch die wirtschaftlich bedeutenden Süßgräser Mais, Hirse, Zuckerrohr und Gerste. Bemerkenswert ist hierbei die hohe Wirtsspezifität der Brandpilze, die meist nur wenige, oder gar nur einen bestimmten Wirt kolonisieren können. Wie Daten aus Untersuchungen vier verschiedener Brandpilze (*U. maydis*, *U. scitaminea*, *Sporisorium reilianum*, *S. sorghi*) belegen, fand die Anpassung an ihre jeweiligen Wirtspflanzen durch coevolutive Prozesse bereits vor mehreren Millionen Jahren statt [MUNKACSI *et al.*, 2007].

*U. maydis* ist ein fakultativ biotropher, Brandpilz und der Verursacher des Beulenbrandes an Mais. *U. maydis* kann ausschließlich *Zea mays* [CHRISTENSEN, 1963] sowie Teosinte (*Zea mays* subsp. *mexicana*, syn. *Euchlena mexicana*), die in Mexiko vorkommende, putative Urform [DOEBLEY, 1992] dieser Kulturpflanze kolonisieren. Erste sichtbare Symptome an infizierten Pflanzen sind das Ausbleichen infizierter Bereiche (Chlorosen) und die Bildung von Anthocyanen [WEBER *et al.*, 2003]. Namens gebend für den Maisbeulenbrand ist die Ausbildung von Pflanzentumoren an allen oberirdischen Teilen der Pflanze, besonders der Kolben. Dies kann zur Reduktion des Ernteertrags um bis zu 10 % führen [AGRIOS, 2005]. In diesen Tumoren werden Teliosporen gebildet, die während ihrer Reifung Melanin einlagern und dadurch eine bräunliche bis schwarze Farbe erhalten und den aufgeplatzten Gallen ein verbranntes (lat: *ustilare* = verbrennen) Aussehen verleihen. *U. maydis* ist ein dimorpher Pilz, der saprophytisch in Form von knospenden, haploiden Sporidien wächst. Diese Sporidien sind unter Laborbedingungen leicht zu

kultivieren und ermöglichen die Anwendung einer Vielzahl biochemischer und molekularbiologischer Techniken [STEINBERG UND PEREZ-MARTIN, 2008]. Der komplette Lebenszyklus von *U. maydis* kann unter Laborbedingungen innerhalb von drei Wochen durchlaufen werden [BANUETT, 1995]. Morphologische Differenzierungsschritte, wie die Induktion von Konjugationshyphen oder dikaryotischen Filamenten, können *in vitro* nachvollzogen werden [SPELLIG *et al.*, 1992; BANUETT, 1995]. Des Weiteren ermöglichen Promotoren, die über die Stickstoff- bzw. Kohlenstoffquelle regulierbar sind, das gezielte Ein- oder Ausschalten von Genen [BOTTIN *et al.*, 1996; BRACHMANN *et al.*, 2001]. Das effiziente System zur homologen Rekombination in *U. maydis* in Verbindung mit der Verfügbarkeit dominanter Selektionsmarker ermöglicht revers genetische Studien durch gezieltes Ausschalten von Genen bzw. deren ektopische Expression [WANG *et al.*, 1988; KRONSTAD *et al.*, 1989; KEON *et al.*, 1991; GOLD *et al.*, 1994B; KOJIĆ UND HOLLOMAN, 2000; KAHMANN UND KÄMPER, 2004; BRACHMANN *et al.*, 2004; HOLLOMAN *et al.*, 2008]. Frei replizierende Plasmide zur Transformation von *U. maydis* wurden entwickelt und dank ihrer hohen Transformationseffizienz können sie zur Komplementation von Deletionsmutanten eingesetzt werden [TSUKUDA *et al.*, 1988]. Zusätzlich sind zellbiologische Techniken, wie verschiedene Färbemethoden [STEINBERG *et al.*, 2001; BANUETT UND HERSKOWITZ, 2002; DOEHLEMAN *et al.*, 2008a] und die Möglichkeit mittels des grün fluoreszierenden Proteins (eGFP) und seiner Varianten *in vivo* zelluläre Prozesse zu beobachten, in den letzten Jahren in *U. maydis* etabliert worden [SPELLIG *et al.*, 1996; STEINBERG *et al.*, 2001]. Diese Möglichkeiten in Verbindung mit der Veröffentlichung der 20,5 Mb Genomsequenz mit etwa 6900 für Proteinen codierende Gene [zusammengefasst in Kahmann und Kämper, 2004; KÄMPER *et al.*, 2006; [http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/ustilago\\_maydis/](http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/ustilago_maydis/); MUMDB: <http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago/>]. Die Sequenz wurde aus 274 Contigs assembliert, die die 23 Chromosome repräsentieren. Die Verfügbarkeit von Affymetrix Microarrays, die eine parallele Expressions-Analyse von ca. 6200 Genen ermöglichen, haben *U. maydis* zu einem etablierten Modellsystem in der molekularen Phytopathologie gemacht.

Ein weiterer Vorteil ist die Verfügbarkeit eines solopathogenen Stammes SG200, einem FB1-Derivat [KÄMPER *et al.*, 2006]. Dieser Stamm trägt eine kompatible bE1/bW2-Kombination und zusätzlich hierzu das *mfa2*-Gen, welches für das a2-Pheromon kodiert. Aufgrund dieser genetischen Modifikation sind in SG200 sowohl der *a*- als auch der *b*- Paarungstyplocus aktiviert. Dies ermöglicht die Ausbildung eines pathogenen Filaments ohne einen entsprechenden Kreuzungspartner. Durch diesen Stamm werden viele Arbeitsschritte wie die Herstellung von

Deletionsmutanten und die Untersuchung der Rolle von Genen in Entwicklungsstadien nach der Fusion kompatibler Paarungspartner wesentlich erleichtert. Der Stamm CI13 [BÖLKER et al., 1995b] trägt das *mfa2*-Gen nicht, daher ist in CI13 lediglich der *b*-Locus aktiviert.

## 1.2 Der Lebenszyklus von *U. maydis*

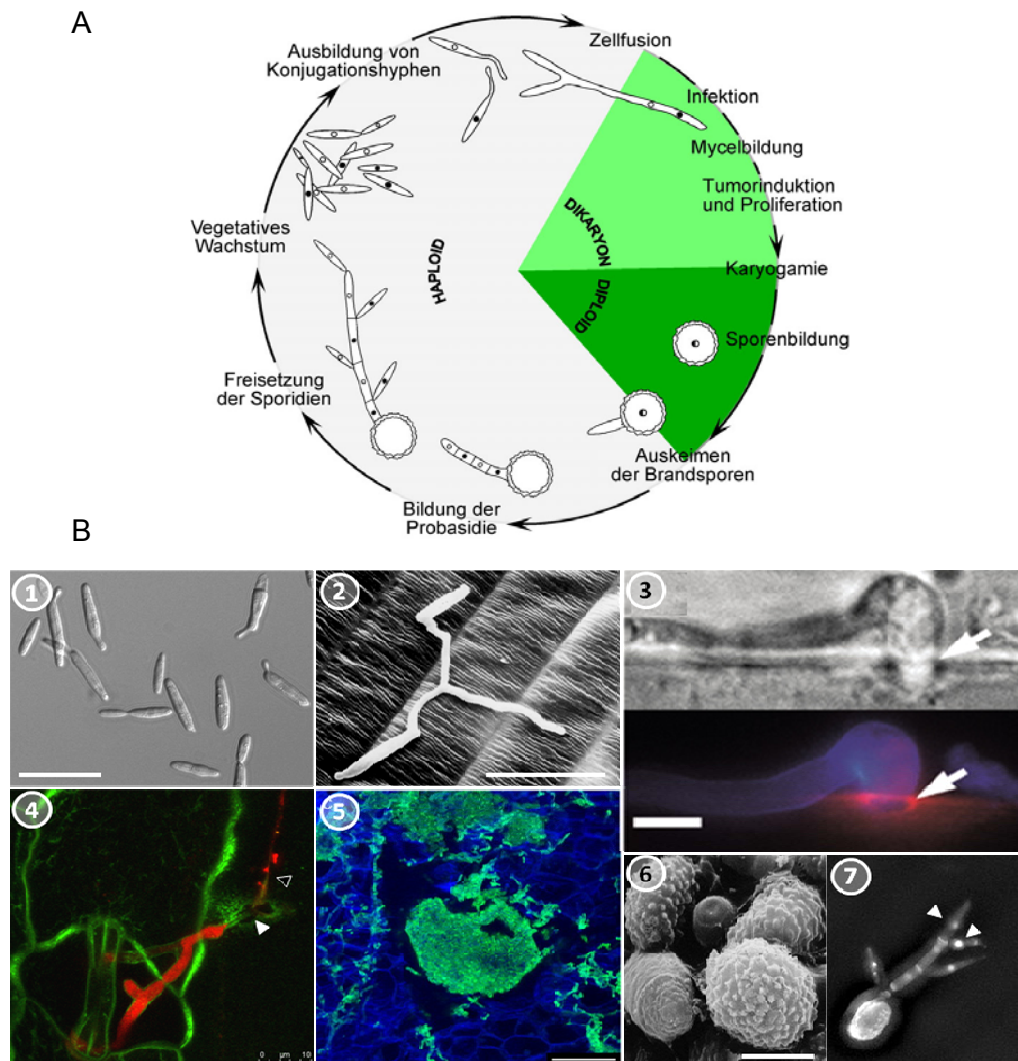
Der Lebenszyklus von *U. maydis* gliedert sich in 3 Kernphasen. Die haploiden, saprophytisch wachsenden Sporidien sind länglich oval (Abb.1 A und B1) und wachsen hefeartig durch Knospung. Haploide Sporidien sind jedoch nicht pathogen, wenn sie in Reinkultur auf die Wirtspflanze treffen. Die Initiation der pathogenen Differenzierung erfolgt erst, nachdem Zellen kompatibler Paarungstypen durch Ausbildung von Konjugationshyphen miteinander fusionieren (Abb. 1 A und B2). Nach der Fusion entsteht ein Dikaryon gebildet, welches in der Lage ist, die Oberfläche der Wirtspflanze zu durchdringen (Abb. 1 B2). Dieser Prozess wird durch ein tetrapolares Paarungssystem, dass die Paarungstyploci *a* und *b* kontrolliert. Der *a*-Locus liegt in zwei Allelen, *a1* und *a2*, vor [ROWELL, 1955; ROWELL AND DEVAY, 1954] und kodiert für ein Zell/Zell Erkennungssystem bestehend aus Vorläufern (*mfa1*, *mfa2*) und Rezeptoren (*pra1*, *pra2*) von Lipopeptid-Pheromonen [BANUETT, 1995]. Nach Perzeption des Pheromons erfolgt die Bildung von Konjugationshyphen die in Richtung des kompatiblen Pheromons wachsen [SNETSELAAR et al., 1996]. Der multiallelische *b*-Locus codiert für zwei verschiedene Homeodomänen Proteine, *bE* und *bW*, die für die weitere pathogene Differenzierung der fusionierten Zellen verantwortlich sind. Die beiden Proteine dimerisieren, wenn sie von verschiedenen Allelen stammen und sind für Filamentbildung und pathogene Entwicklung essentiell [BRACHMANN et al., 2001]. Dies konnte gezeigt werden, indem haploide Stämme konstruiert wurden, die hybride *bE1/bW2* Allele tragen und solopathogen d.h. ohne vorhergehende Paarung mit einem kompatiblen Partner, die Wirtspflanze infizieren können [BÖLKER et al., 1995a].

Das Heterodimer bindet an ein konserviertes Homeodomän-Bindemotif (*bbs*, „b-binding site“) und reguliert so direkt oder indirekt die Expression von ca. 350 Genen [BRACHMANN et al., 2001; BAKKEREN et al., 2008; Kämper J. und Scherer M., pers. Mitteilung]. Diese Gene regulieren Zellwandmodifikationen, Zellzyklus, Mitose und DNA Reparatur. Nach Expression des *bE/bW*-Heterodimers erfolgt ein Zellzyklusarrest der erst nach der Penetration der Pflanze wieder aufgehoben wird.

Unter den b-regulierten Genen befinden sich Transkriptionsfaktoren wie *biz1*, *rbf1*, und *hdp2*, die alle für die pathogene Entwicklung benötigt werden [FLOR-PARRA *et al.*, 2006]. Das dikaryotische Filament (Abb. 1 B2) wächst zunächst auf der Oberfläche der Wirtspflanze, wobei stets nur die Spitzenzelle der Hyphe mit Zytoplasma gefüllt ist. Die dahinter liegenden leeren Abschnitte entstehen durch Vakuolisierung und dem regelmäßigen Einziehen von Septen am distalen Ende der Spitzenzelle [STEINBERG *et al.*, 1998; BANUETT UND HERSKOWITZ, 1994b]. Der nächste Schritt in der pathogenen Differenzierung ist die Bildung der Infektionsstrukturen, der sogenannten Appressorien (Abb.1. B3) [SNETSELAAR UND MIMS, 1992]. Das *U. maydis* Appressorium entsteht aus einer terminalen Verdickung der Spitzenzelle, die vermutlich aus einer Veränderung der Wachstumsrichtung resultiert [SNETSELAAR UND MIMS, 1993]. Zytologische Untersuchungen zeigten, dass *U. maydis* Appressorien nicht melanisiert sind und es unmittelbar vor der Penetration nicht zu einer signifikanten Akkumulation von Zytoplasma im Appressorium kommt [SNETSELAAR UND MIMS, 1993]. Die Penetration erfolgt wahrscheinlich über Zellwandabbauende Enzyme. Es gibt keine Evidenz für die Bildung von Turgor und mechanische Penetration. Die physikalischen und chemischen Stimuli, die für die Induktion der Appressorienbildung verantwortlich sind, waren zu Beginn dieser Arbeit noch weitestgehend unbekannt.

Nach Penetration dringt die Infektionshyphe des Pilzes in die Wirtszelle ein (Abb.1 B4). Dabei besteht kein direkter Kontakt zum Zytoplasma, sondern die Plasmamembran der Wirtszelle wird invaginiert und umschließt die Hyphe [SNETSELAAR UND MIMS, 1993; DOEHLEMAN *et al.*, 2008a, b]. Hierdurch entsteht eine Interaktionsmatrix zwischen Pilz und Pflanze. In dieser biotrophen Matrix akkumulieren, wahrscheinlich durch pilzliche Sekretion, zahlreiche Vesikel [BAUER *et al.*, 1997]. Da *U. maydis* keine speziellen Strukturen zur Nährstoffaufnahme besitzt, wie z. B. die Haustorien der Rostpilze [STRUCK *et al.*, 1996, HAHN UND MENDGEN, 1997] besitzt, ist anzunehmen, dass der Signal- und Nährstoffaustausch über diese Matrix zwischen Pilz und Pflanze geschieht. In dieser frühen Phase der Interaktion zwischen Pilz und Wirtspflanze, bevor die biotrophe Interaktion etabliert wird, erfolgt zunächst eine Erkennung des Pilzes, was zu einer Aktivierung der pflanzlichen Abwehr führt [DOEHLEMAN *et al.*, 2008b]. Die erste aktive Abwehr der Pflanze beinhaltet vereinzelt auch den so genannten „oxidativen burst“, eine Ausschüttung von radikalischen Sauerstoffspezies (ROS) in den angegriffenen Zellen [DOKE *et al.*, 1996; DOEHLEMAN *et al.*, 2008b]. Dies dient als Signal für die Induktion von hypersensitivem Zelltod und wird vor allem bei nekrotrophen Pathogenen wie *Botrytis cinerea* beobachtet, wo der induzierte Zelltod Voraussetzung für die Kolonisierung

der Pflanze ist [GOVRIN *et al.*, 2006]. Nach Infektion mit *U. maydis* wird die Entstehung von ROS aktiv durch ein Yap1-Kontolliertes Detoxifikationssystem unterdrückt [MOLINA UND KAHMANN, 2007].



**Abbildung 1: Stadien der pathogenen Entwicklung von *U. maydis*.** (A) Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *U. maydis* nach Brachmann *et al.*, 2001. (1) Haploide Sporidien vermehren sich asexuell durch Knospung; Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m. (2) Fusion zweier haploider Sporidien und Dikaryenbildung auf der Blattoberfläche [SNETSELAAR UND MIMS, 1993]; Maßstabsbalken 20  $\mu$ m. (3) Oben, DIC Bild eines Appressoriums; unten, Epifluoreszenzbild mit Calcofluor gefärbter Pilzzellwand (blau) und endozytotische Vesikel gefärbt mit dem Endozytosemarker FM4-64 (rot). Der Ring um die Penetrationsstelle (Pfeil) zeigt Endozytose an der Penetrationsstelle [KÄMPER *et al.*, 2006]; Maßstabsbalken 5  $\mu$ m. (4) Invasives Wachstum von Zelle zu Zelle in der Epidermis nach Penetration der Pflanzenoberfläche. Der hier verwendete *U. maydis* Stamm exprimiert zytoplasmatisch RFP (rot), die pflanzliche Plasmamembran ist mit YFP markiert (grün) [DOEHLEMAN *et al.*, 2009]. (5) Proliferation im Apoplasten, grüne Fluoreszenz von WGA-AF 488 gefärbten Hyphen überlagert mit UV-Laser (405 nm) induzierter Autofluoreszenz; Maßstabsbalken: 100  $\mu$ m [DOEHLEMAN *et al.*, 2008a]. (6) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *U. maydis* Teliosporen; Maßstabsbalken: 5  $\mu$ m. (7) Auskeimende Teliospore von *U. maydis*, gefärbt mit DAPI und Calcofluor. Zellwand, Septen und Kerne (Pfeile) sind sichtbar (Bilder 6 und 7 freundlicherweise von K.Snetselaar zur Verfügung gestellt).

Sobald die biotrophe Interaktion etabliert wurde, tritt eine signifikante Abschwächung der Abwehrreaktion auf und im weiteren Verlauf werden pflanzliche Gene, die in der Unterdrückung von Zelltod eine Rolle spielen, induziert [DOEHLEMAN *et al.*, 2008b]. Während der nun beginnenden Proliferation des dikaryotischen Filaments entwickeln sich an jedem Septum schnallenähnliche Fortsätze, die für die Kernverteilung wichtig sind [SCHERER *et al.*, 2006]. Diese Art des Wachstums setzt sich fort und der Pilz kolonisiert die Epidermiszellen, das vaskuläre Gewebe und das Mesophyll der Wirtspflanze [SNETSELAAR UND MIMS, 1994; BANUETT UND HERSKOWITZ, 1996]. Im Apoplasten der Pflanze bilden sich drei bis vier Tage nach der Infektion Aggregate aus Hyphen und es kommt zu einer massiven Proliferation (Abb. 1. B5). Nach fünf Tagen können neben Chlorosen bereits erste kleine Wucherungen auf der Pflanzenoberfläche beobachtet werden, was auf Zellvergrößerung und Deformation der Pflanzenzellen zurückzuführen ist [DOEHLEMAN *et al.*, 2008a]. In den späteren Stadien der Tumorentwicklung finden sich pilzliche Hyphen in großen Aggregaten, die sich in Hohlräumen zwischen den ansonsten dicht gepackten Pflanzenzellen im Tumorgewebe bilden. Diese Hohlräume entstehen vermutlich durch den enzymatischen Abbau der Mittellamelle [DOEHLEMAN *et al.*, 2008a]. Während der Tumorbildung kommt es zu einer tief greifenden Umprogrammierung des Pflanzenmetabolismus, wodurch das mit *U. maydis* infizierte Blatt „sink“-Gewebe bleibt, wohingegen das Uninfizierte zu einem „source“-Gewebe wird. Dies führt zu einer für „sink“-Gewebe typischen Anreicherung von freien Hexosen, die von *U. maydis* vermutlich als Energiequelle für die massive Proliferation in dieser Entwicklungsphase benötigt werden [DOEHLEMAN *et al.*, 2008b; HORST *et al.*, 2008]. Im weiteren Verlauf der Differenzierung fragmentieren die Hyphen innerhalb und außerhalb dieser Aggregate. Umhüllt von einer extrazellulären adhäsiven Matrix runden sich die fragmentierten Hyphen ab, lagern Melanin in die Zellwand ein und reifen so zu Teliosporen (Abb. 1 B6) [BANUETT UND HERSKOWITZ, 1996]. Während dieses letzten Differenzierungsschrittes kommt es zur Karyogamie, und somit ist hier die dritte, diploide, Kernphase zu beobachten. Die Teliosporen werden nach ihrer Freisetzung aus dem Tumorgewebe durch Wind, Regen oder Insekten verbreitet und behalten ihre Keimungsfähigkeit über Jahre hinweg [CHRISTENSEN, 1963]. Unter günstigen Bedingungen wie hoher Umgebungsfeuchte und milden Temperaturen keimen die Teliosporen aus. Dabei kommt es zur Meiose und die haploiden Kerne wandern in den Keimschlauch der Probasidie. Es entstehenden Basidiosporen (Sporidien), die dann sukzessive abgeschnürt werden (Abb. 1 B7).



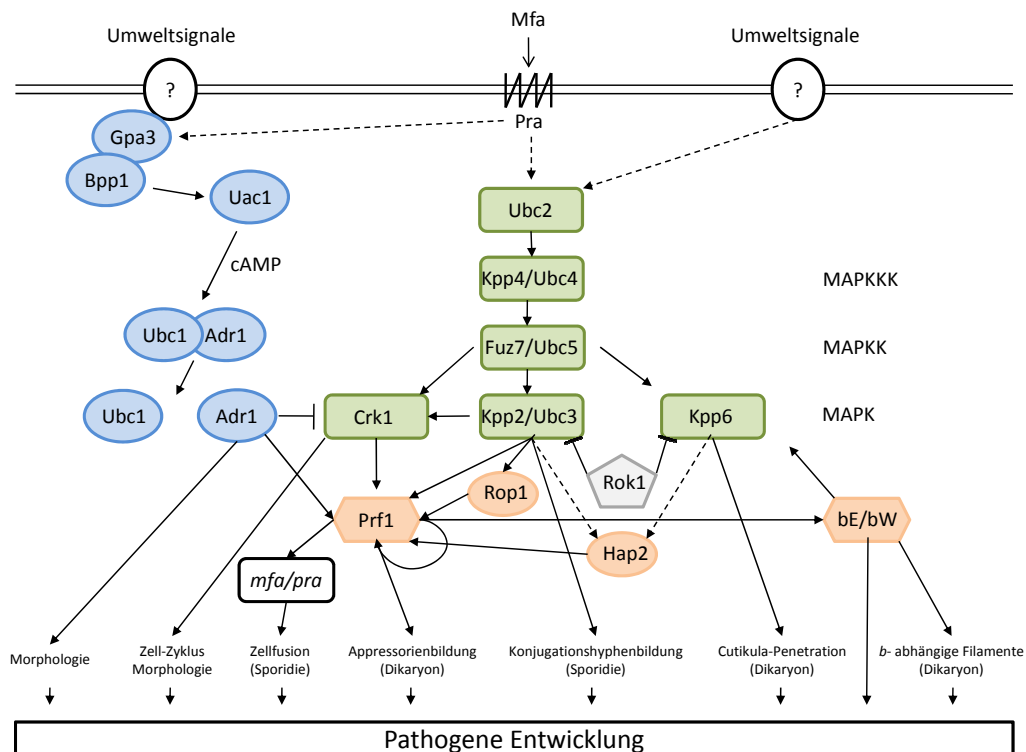
Die Kommunikation von *U. maydis* mit seinem Wirt geschieht höchstwahrscheinlich über sekretierte Effektoren. *U. maydis* besitzt 386 putativ sekretierte Proteine, davon 276 *U. maydis* spezifische bzw. ohne definierte InterPro Domänen [MÜLLER *et al.*, 2008]. In *U. maydis* sind viele dieser putativen Effektoren in Genclustern organisiert, die während der Kolonisierung der Wirtspflanze transkriptionell hochreguliert werden [KÄMPER *et al.*, 2006] und die Interaktion mit der Pflanze steuern. Mit Pep1 konnte kürzlich der erste sekretierte Effektor, der für die erfolgreiche Kolonisierung des Wirtsgewebes essentiell ist, charakterisiert werden [DOEHLEMAN *et al.*, 2009].

### 1.3 Die Signaltransduktion während der frühen Phase der pathogenen Entwicklung

Die Verarbeitung des Pheromonsignals und die Regulation der pathogenen Entwicklung ist in *U. maydis* abhängig von einem komplexen regulatorischen Netzwerk aus cAMP und MAPK Signaltransduktion (für Übersichten: KAHMANN UND KÄMPER, 2004 und NADAL *et al.*, 2008]. Die Pheromonantwort erfolgt, nach Perzeption des Pheromons über den Rezeptor Pra, über die cAMP-Signalkaskade und ein MAPK-Modul, zwei konservierte Signaltransduktionswege (Abb. 2). Die Effektoren, die das Pheromonsignal vom Rezeptor an die Signalwege weiterleiten, sind nicht bekannt.

Im cAMP-Signalweg (Abb. 2, blaue Elemente) wurden bisher folgende Signalkomponenten identifiziert: Die  $\alpha$ -Untereinheit Gpa3 des heterotrimeren G-Proteins [MÜLLER *et al.*, 2004], dessen  $\beta$ -Untereinheit Bpp1 [KRÜGER *et al.*, 1998; REGENFELDER *et al.*, 1997], die Adenylatcyclase Uac1 [GOLD *et al.*, 1994] und die cAMP-abhängigen Protein Kinase A (PKA), die aus der regulatorischen Untereinheit Ubc1 und der katalytischen Untereinheit Adr1 besteht [GOLD *et al.*, 1994; DÜRRENBARGER *et al.*, 1998]. Die Bindung der regulatorischen Ubc1 an die katalytische Adr1 blockiert die Aktivität der PKA. Wenn cAMP an seine Bindestellen in Ubc1 bindet, ändert dieses seine Konformation, Adr1 dissoziiert und wird so aktiv [GOLD *et al.*, 1994; DÜRRENBARGER *et al.*, 1998]. Aktivierung der Kaskade durch exogenes cAMP, durch Expression eines dominant aktiven *gpa3*<sub>Q206L</sub>-Allels oder Deletion von *ubc1* führen zu einer starken Aktivierung der Pheromon-Genexpression [HARTMANN *et al.*, 1999; KÜGER *et al.*, 1998; MÜLLER *et al.*, 1999; REGENFELDER *et al.*, 1997]. Mutationen der Adenylatcyclase *uac1* oder der katalytischen Untereinheit

*adr1* verringern die PKA Aktivität und bewirken konstitutiv filamentöses Wachstum [GOLD *et al.*, 1994; DÜRRENBARGER *et al.*, 1998]. In der *uac1* Mutante kann durch Zugabe von cAMP die Filamentbildung unterdrückt werden [DÜRRENBARGER *et al.*, 1998]. Daraus folgt, dass die Zellteilung von *U. maydis* von einer aktiven PKA abhängig ist, während Zellen ohne *adr1* filamentös wachsen. Bei erhöhter PKA Aktivität (durch Deletion von der regulatorischen Untereinheit *ubc1*, bzw. die Zugabe von cAMP) beobachtet man einen Phänotyp, bei dem die Zellen durch Knospung wachsen, jedoch nicht mehr in der Lage sind, sich abzuschnüren (mutiple budding) [LARRAYA *et al.*, 2005]. Eine direkte Verbindung zwischen Gpa3 und dem Pheromonrezeptor Pra konnte bisher nicht gezeigt werden. Pheromonstimulation sowie Zugabe von cAMP führen jedoch zu einer erhöhten Expression der Gene des *a*-Locus [KAFFARNIK *et al.*, 2003].



**Abbildung 2: Signalkaskaden für die Zellfusion und die pathogene Entwicklung von *U. maydis*.** Nähere Informationen im Text. Blau: Komponenten des cAMP Signalwegs, grün: Komponenten der MAP-Kinase Kaskade; orange: Transkriptionsfaktoren; grau: Phosphatase Rok1; Pfeile: physikalische oder genetische Interaktionen; gestrichelte Pfeile: fehlende Komponenten bzw. Interaktion nicht nachgewiesen (modifiziert nach Kahmann und Kämper, 2004).

Das MAPK-Modul (Abb. 2, grüne Elemente) setzt sich aus der MAPKK-Kinase Kpp4/Ubc4 [ANDREWS *et al.*, 2000; MÜLLER *et al.*, 2003] und der MAPK-Kinase Fuz7/Ubc5 [BANUETT UND HERSKOWITZ, 1994b; ANDREWS *et al.*, 2000] zusammen,

die der MAPK Kpp2 vorgeschaltet sind [MÜLLER *et al.*, 1999; MAYORGA UND GOLD, 1999]. Die MAP-Kinase Crk1 besitzt eine wesentliche Rolle in der Morphogenese von *U. maydis*. Überexpression führt zu filamentösem Wachstum, während die Deletion den konstitutiv filamentösen Phänotyp einer *adr1* Deletionsmutante unterdrückt [GARRIDO UND PEREZ-MARTIN, 2003]. In *crk1* Deletionsmutanten konnte keine Expression von *prf1* mehr nachgewiesen werden, was die Ursache für ihren apathogenen Phänotyp ist. Wichtig für die Funktion von Crk1 ist die Phosphorylierung innerhalb des T-Loop TXY Motif, die zumindest zum Teil durch Fuz7/Ubc5 erfolgt [GARRIDO *et al.*, 2004]. Im Gegenzug wird *crk1* auf transkriptioneller Ebene durch den cAMP-Signalweg negativ reguliert. Das macht Crk1 zu einer Schlüsselkomponente bei dem Wechsel zwischen filamentösem Wachstum und Knospungswachstum [GARRIDO *et al.*, 2004].

Ubc2, welches strukturell mit Ste50p aus *Saccharomyces cerevisiae* verwandt ist [MAYORGA UND GOLD, 2001], ist ein Adapterprotein oberhalb von Kpp4/Ubc4. Ste50p interagiert in *S. cerevisiae* direkt mit Ste11p, einem Ubc4 Ortholog, und reguliert dessen Aktivität während der Pheromonantwort. Eine Interaktion von Ubc2 und Ubc4 in *U. maydis* konnte gezeigt werden [KLOSTERMANN *et al.*, 2008]. Ubc2 besitzt, im Gegensatz zu Ste50p, einen Basidiomyceten-spezifischen C-Terminus mit zwei SH3 Domänen. Interessanterweise spielt diese Region für die Regulation des Dimorphismus keine Rolle, ist jedoch essentiell für die Pathogenese [KLOSTERMANN *et al.*, 2008].

Im MAP-Kinase Signalweg agiert noch eine dritte MAP-Kinase, Kpp6. Sie wurde als *b*-induziertes Gen entdeckt und weist starke Ähnlichkeiten mit Kpp2 auf [BRACHMANN *et al.*, 2003]. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass Kpp6 direkt von Fuz7/Ubc5 phosphoryliert wird [DI STASIO *et al.*, 2009]. Zwischen Kpp6 und Kpp2 besteht partielle genetische Redundanz [BRACHMANN *et al.*, 2003], jedoch besitzen die beiden Proteine unterschiedliche Funktionen. Durch Experimente mit nicht phosphorylierbaren Allelen von *kpp2* (*kpp2AEF*) und *kpp6* (*kpp6AEF*) konnte gezeigt werden, dass Kpp2 unter anderem für die Konjugationshyphenbildung und Appressorienbildung benötigt wird [MÜLLER *et al.*, 2003]. Kpp6 hingegen ist für die Funktionalität der Appressorien essentiell und vermutlich an der Regulation des Penetrationsprozesses beteiligt [BRACHMANN *et al.*, 2003].

Die Charakterisierung der Phosphatase Rok1 (vgl. Abb. 2), welche die MAP-Kinasen Kpp2 und Kpp6 dephosphoryliert, zeigte die Bedeutung der Phosphorylierung dieser beiden MAP-Kinasen für die Pathogenese von *U. maydis* auf. In *rok1* Deletionsmutanten ist eine erhöhte Phosphorylierung von Kpp2 und Kpp6 nachweisbar. Dies führt zu einer gesteigerten Paarungseffizienz, was die Bildung

von *b*-abhängigen Filamenten und damit die Virulenz signifikant erhöht [DI STASIO *et al.*, 2009].

cAMP- und MAPK-Wege führen unter anderem zur Aktivierung von Prf1 (pheromone response factor 1, Abb. 2) [HARTMANN *et al.*, 1996; URBAN *et al.*, 1996; BRACHMANN *et al.*, 2001], dem Schlüsselement in dieser Signalkaskade, die das Pheromonsignal mit Genexpression verknüpft. Prf1 ist ein HMG (high mobility group) Domänen Transkriptionsfaktor, der sogenannte „pheromone-response elements“ (PREs) in der Promoterregion von Pheromon regulierten Genen erkennt. Im *prf1* Promotor befinden sich zwei PREs, die vermutlich Autoregulation erlauben [HARTMANN *et al.*, 1996; 1999]. Eine basale Transkription von *prf1* muss in der Zelle vorhanden sein, um die Expression der Gene des *a*-Locus zu gewährleisten. Im Promoter von *prf1* selbst wurde ein weiteres regulatorisches UAS-Element („upstream activating sequence“) identifiziert, welches die *prf1*-Expression in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit von Nährstoff- und Kohlenstoffquellen reguliert [HARTMANN *et al.*, 1999]. Wird eine Zelle Pheromon-stimuliert, wird Prf1 durch posttranslationale Phosphorylierung voll aktiviert. Prf1 enthält fünf putative PKA- und sechs putative MAPK-Phosphorylierungsstellen [KAFFARNIK *et al.*, 2003]. Adr1 phosphoryliert Prf1 und dies ist essentiell und hinreichend für die Induktion der Gene des *a*-Locus [KAFFARNIK *et al.*, 2003]. Für die vollständige Aktivierung von Prf1 und ist neben Phosphorylierung von Prf1 durch Adr1 auch die Phosphorylierung durch die MAP-Kinase Kpp2/Ubc3 essentiell [MÜLLER *et al.*, 1999; MAYORGA UND GOLD, 1999]. In dieser Form ist Prf1 dann in der Lage die *b*-Gene zu induzieren. Dies führt schließlich zur Einleitung von Schlüsselschritten der pathogenen Differenzierung (Zellfusion, Appressorienbildung, Penetration der Pflanzenoberfläche). Die Bildung von Konjugationshyphen benötigt sowohl eine Aktivierung des cAMP wie auch des MAPK Wegs, erfolgt jedoch auch in Abwesenheit von Prf1 [MÜLLER *et al.*, 2003]. Die Transkription von *prf1* wird zum einen durch die MAP-Kinase Crk1, einen noch unbekannten Transkriptionsfaktor, durch Prf1 selbst sowie durch mindestens zwei weitere nachgeschaltete Transkriptionsfaktoren (Rop1 und Hap2) reguliert [GARRIDO *et al.*, 2004; BREFORT *et al.*, 2005.; MENDOZA-MENDOZA *et al.*, 2009b]. In diesem Netzwerk wird die Aktivität von Rop1 durch Kpp2 [BREFORT *et al.*, 2005] sowie die von Hap2 durch Kpp2 oder Kpp6 reguliert [MENDOZA-MENDOZA *et al.*, 2009b].

## 1.4 Pathogenitätsrelevante Signaltransduktion in anderen pflanzenpathogenen Pilzen

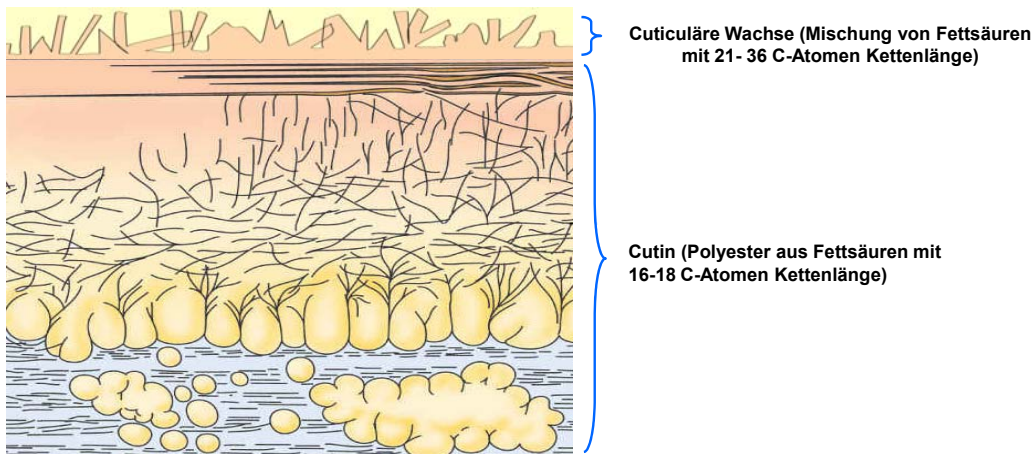
Auch in anderen Pilzen übernehmen MAPK Signalwege eine wichtige Rolle in der pathogenen Entwicklung. In dem Reisbranderreger *Magnaporthe grisea*, einem Ascomyceten, konnte gezeigt werden, dass das Kpp2 Homolog PMK1 essentiell für pathogene Entwicklung und Appressorienbildung ist [XU UND HAMER, 1996]. PMK1 Homologe in anderen Pathogenen wie *Colletotrichum lagenarium* CMK1 [TAKANO *et al.*, 2000], *Fusarium oxysporum* FMK1 [DIPIETRO *et al.*, 2000] *Botrytis cinerea* BMP1 [ZHENG *et al.*, 2000; DOEHLEMAN *et al.*, 2006] konnten als essentielle Faktoren in der Appressorienbildung identifiziert werden. Die MAPK Bmp3 spielt in *B. cinerea* eine Rolle während der Penetration und Kolonisierung des Wirtsgewebes. Es wird vermutet, dass sie an der Oberflächenerkennung beteiligt ist [RUI UND HAHN, 2007]. Das zu Bmp3 orthologe Protein MpkA aus *U. maydis* hat jedoch keine Bedeutung für die Pathogenese (Perez-Martin, persönl. Mitteilung).

Orthologe der MAPK Hog1p aus *S. cerevisiae*, wie z.B. CaHog1 in *Candida albicans*, Osm1 in *M. grisea*, BcSak1 in *B. cinerea* haben diverse Funktionen. In *S. cerevisiae* ist Hog1p essentiell für das Überleben unter osmotischem Stress [NEVOIGT UND STAHL, 1997]. In *C. albicans* [ALONSO-MONGE *et al.*, 1999] und in *B. cinerea* [SEGMÜLLER *et al.*, 2007] sind sie essentiell für die Virulenz, jedoch haben beide noch weitere Phänotypen. In *M. grisea* hingegen erfüllt Osm1 zwar die Funktionen analog zu Hog1 in *S. cerevisiae*, besitzt jedoch keinerlei Einfluss auf die pathogene Entwicklung [DIXON *et al.*, 1999]. In *U. maydis* konnte die Funktion des Hog1p Orthologs Osm2 bislang nicht aufgeklärt werden, da keine Deletionsmutanten generiert werden konnten (A. Mendoza-Mendoza, persönliche Mitteilung).

Auch die Komponenten des cAMP Signalweges sind in pflanzenpathogenen Pilzen hoch konserviert [LEE *et al.*, 2003]. Eine strenge Regulation der PKA-Aktivität ist nicht nur in *U. maydis*, sondern auch in *M. grisea* [MITCHELL UND DEAN, 1995; LIU UND DEAN, 1997], *C. trifolii* [YANG UND DICKMAN, 1999] und *B. cinerea* [DOEHLEMAN *et al.*, 2006] essentiell für die pathogene Differenzierung und die Kontrolle des vegetativen Wachstums. Darüber hinaus ist der cAMP Signalweg eng mit andern Signalwegen, vor allem dem MAPK Signalweg, verknüpft. Dies führt zu einer koordinierten Regulation mit einer Vielzahl verschiedener „Inputs“ während der pathogenen Differenzierung [LEE *et al.*, 2003].

## 1.5 Die frühe Pilz- Pflanze Interaktion

Die Cuticula ist die erste Barriere der Pflanze gegen Pathogenbefall [EIGENBRODE UND ESPELIE, 1995]. Die Cuticula bedeckt alle oberirdischen Teile einer Pflanze und ihre Dicke variiert von 1  $\mu\text{m}$  bis 14  $\mu\text{m}$  [MARTIN UND JUNIPER, 1970]. Sie besteht aus zwei Schichten: einer Oberfläche aus Wachsen sowie, darunter liegend, einer festen Matrix aus Cutin, in die intracuticuläre Wachse eingeschlossen sind [KOLATTUKUDY, 2001, Abb. 3]. Diese Cutinschicht, die aus quervernetzten  $\text{C}_{16}$  und  $\text{C}_{18}$  Hydroxy-Fettsäuren besteht, stellt hierbei die physische Barriere für das Pathogen dar [PURDY UND KOLATTUKUDY, 1975].



**Abbildung 3: Aufbau der pflanzlichen Cuticula.** Gezeigt ist der schematische Aufbau der Cuticula, bestehend aus epicuticulären Oberflächenwachsen und dem darunterliegenden Cutin mit eingelagerten intracuticulären Wachsen. [nach BUCHANNAN *et al.*, 2000]

Der Kontakt des Pilzes mit der Cuticula ist der erste entscheidende Schritt der Interaktion zwischen Pilz und Wirtspflanze [DIXON UND LAMB, 1990]. Die Pflanzenoberfläche bietet eine Vielzahl von chemischen und physikalischen Signalen, die von pathogenen Pilzen wahrgenommen werden können und Differenzierung sowie die Appressorienbildung induzieren. Bei den biotrophen Rostpilzen *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* und *Uromyces appendiculatus* führen Oberflächenstrukturen dazu, dass der Pilz sein Appressorium genau über den Stomata der Wirtspflanze bildet. Dabei reagiert der Pilz auf die Oberflächentopographie der Schließzellen, und durch deren Nachbildung konnten Infektionsstrukturen auf künstlichen Oberflächen erzeugt werden [WYNN, 1976]. Schließlich konnte gezeigt werden, dass alleine die Abstufung der Oberfläche, die an der Schließzelle entsteht (0,5  $\mu\text{m}$ ), die Appressorienbildung induziert [HOCH *et al.*, 1987]. Für *M. grisea* oder *Colletotrichum* Spezies wurden Vorhandensein einer

harten Oberfläche bzw. deren hydrophobe Eigenschaften als wesentliche Stimuli für die Induktion der Appressorienbildung identifiziert [JELITO *et al.*, 1994; KIM *et al.*, 1998]. Die Härte der Oberfläche spielt dabei für *M. grisea* die größte Rolle. Der hydrophobe Stimulus hingegen kann durch pflanzliche Cutinmonomere und Wachskomponenten, vor allem 1,16-Hexadecandiol sowie durch verschiedene Fettsäuren ersetzt werden. Umgekehrt werden diese chemischen Reize auf einer hydrophoben Oberfläche nicht benötigt [GILBERT *et al.*, 1996]. Fettsäure und hydrophober Stimulus können durch Stimulation des cAMP/PKA oder des PKC Weges ersetzt werden [LEE UND DEAN, 1993; SKAMNIOTI UND GURR, 2007]. Auch in dem Avocado-Pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* spielen Fettsäuren eine Rolle bei der Induktion von Appressorien; sie kann durch Zugabe von Wachspräparationen seiner Wirtspflanze *in vitro* induziert werden [KIM *et al.*, 1998]. Hydrophobizität und Oberflächenwachse konnten ebenfalls für den obligat biotrophen Pilz *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* als essentielle Stimuli für Keimung und Appressorienbildung identifiziert werden [ZABKA *et al.*, 2008]. In *C. gloeosporioides* konnte mit dem Pflanzenhormon Ethylen ein weiterer Appressorien-induzierender Stimulus beschrieben werden. Transgene Tomatenpflanzen, die nicht mehr in der Lage sind, Ethylen zu produzieren und mit *C. gloeosporioides* infiziert wurden, induzieren die Bildung von Appressorien mit einer im Vergleich zur Wildtyp Pflanze geringeren Effizienz [FLAISHMAN UND KOLATTUKUDY, 1995].

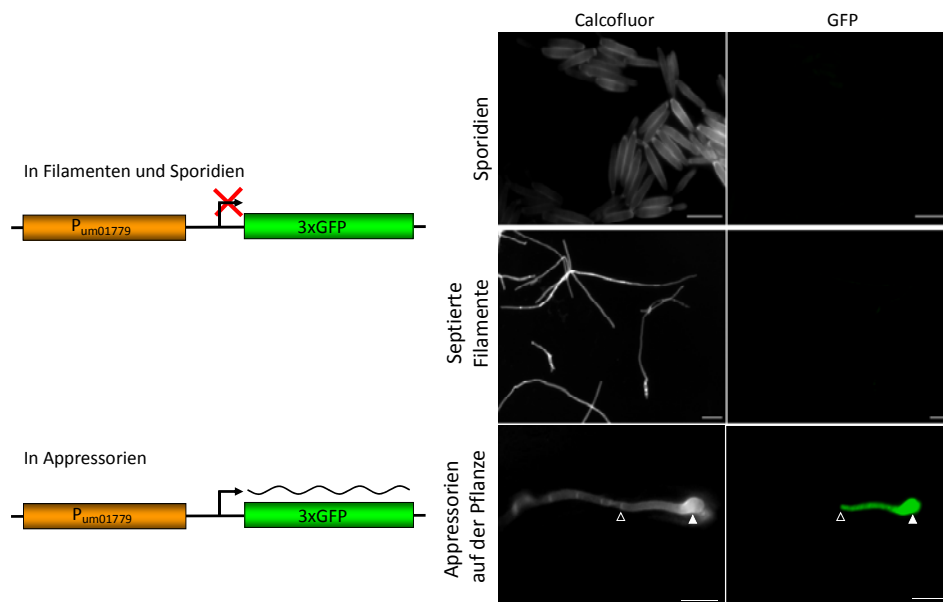
Für *U. maydis* konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Detergenzien und Lipiden die Bildung von Filamenten induzieren kann. Diese Filamente hatten morphologische Ähnlichkeiten mit in der Pflanze wachsenden Hyphen [KLOSE *et al.*, 2004]. Die Bildung von Appressorien konnte nicht beobachtet werden. Versuche, die Filament- und Appressorienbildung *in vitro* durch Aufbringen auf hydrophobe Oberflächen zu induzieren, blieben bisher ebenfalls ohne Erfolg [BREFORT *et al.*, 2005].

Bezüglich des Penetrationsmechanismus unterscheidet sich *U. maydis* von anderen pflanzenpathogenen Pilzen wie *M. grisea* oder *Colletotrichum* spezieis [STAPLES 1985; BECHINGER *et al.*, 1999; TALBOT, 2003]. In diesen Pilzen ist Appressorienbildung durch Melanineinlagerung und Turgorbildung durch Einlagerung von Osmolyten gekennzeichnet [BECHINGER *et al.*, 1999, TALBOT, 2003]. Bei der Differenzierung der Appressorien werden diese durch ein Septum von ihrem unmelanisierten Keimschlauch getrennt. Die reifen Appressorien dieser Pilze penetrieren vor allem durch den enormen Druck (bis zu 8 MPa in *M. grisea*), der in dieser verstärkten, abgekapselten Struktur aufgebaut wird [HOWARD *et al.*, 1995]. Damit werden die Strukturen der eigentlichen Bedeutung des Wortes Appressorium

(*lat.* apprimere = dagegen drücken) gerecht und heben sich morphologisch deutlich von dem Keimschlauch ab, von dem sie ausgehen.

Im Gegensatz dazu ist das Appressorium in *U. maydis* morphologisch eher unauffällig. Während des Penetrationsprozesses befindet sich das Septum nicht in der Nähe des unmelanierten Appressoriums an der Hyphenspitze (Abb. 2) [SNETSELAAR UND MIMS, 1993]. Ein Septum in der Nähe des Appressoriums wird erst nach erfolgter Penetration eingezogen. Die legt den Schluss nahe, dass *U. maydis* nicht mechanisch, sondern vor allem mit Hilfe lytischer Enzyme die Cuticula penetriert [SNETSELAAR UND MIMS, 1993; SCHIRAWSKI *et al.*, 2005; DOEHLEMANN *et al.*, 2008a].

Die Untersuchung dieses Stadiums wurde durch die Identifizierung eines molekularen Markers wesentlich erleichtert [MENDOZA-MENDOZA *et al.*, 2009a]. Appressorien von *U. maydis* sind zwar durch eine charakteristische Schwellung an der Hyphenspitze gekennzeichnet, jedoch können Schwellungen von Hyphen auch durch andere Faktoren, wie zum Beispiel die Nährstoffversorgung, hervorgerufen werden [KLOSE UND KRONSTAD, 2006].



**Abbildung 4: Die Aktivität der *um01779* Promoters ist auf die Spitzenzelle des *U. maydis* Filaments beschränkt, die ein Appressorium bildet.** SG200AM1 wurde unter verschiedenen Bedingungen auf die Expression von GFP unter der Kontrolle des *um01779* Promoters, der mit 3 Kopien des *eGFP* Gens fusioniert ist, hin untersucht. Weder in sich teilenden Zellen die in YEPSL kultiviert wurden, noch in Filamenten, die unter *in vitro* Bedingungen auf aktivkohlehaltigem Medium beobachtet wurden, wird GFP exprimiert. Appressorien (gefüllte Pfeilspitze) auf der Pflanzenoberfläche werden intensiv durch Calcofluor gefärbt und die Spitzenzelle nach dem letzten Septum (offene Pfeilspitze) zeigt GFP Fluoreszenz. Alle Maßstabsbalken: 10 µm (nach MENDOZA-MENDOZA *et al.*, 2009a).



In einem Microarray-Experiment (M. Vraneš und J. Kämper, unveröffentlicht) konnten *U. maydis* Gene identifiziert werden, die zum Zeitpunkt der Appressorienbildung 16 Stunden nach Inokulation auf der Pflanzenoberfläche transkriptionell stark induziert sind. Die Promotoren von vier dieser Gene wurden mit je drei Kopien des eGFP Gens fusioniert und in den *ip*-Locus [LOUBRADOU *et al.*, 2001] von *U. maydis* eingebracht. Eines dieser Gene, *um01779*, wurde in Hyphen, die ein Appressorium entwickelt haben aktiviert und seine Expression ist in früheren Stadien nicht feststellbar (Abb. 4). Der Marker wurde AM1 genannt und der solopathogene Stamm SG200AM1 ist ein wichtiges Werkzeug zur sicheren Identifizierung von Spitzenzellen von Hyphen, die ein Appressorium differenzieren.

## 1.6 Fragestellung der Arbeit

*U. maydis* durchläuft während der frühen pathogenen Entwicklung auf der Pflanzenoberfläche zwei distinkte morphologische Differenzierungsschritte: Filamentbildung und Appressorienbildung. Für die Differenzierungsschritte ist der Transkriptionsfaktor Prf1 essentiell. Für die *prf1*-Expression, für die Konjugationshyphenbildung nach Pheromonstimulation und für die Fusion kompatibler haploider Stämme, ist ein weiterer Transkriptionsfaktor, Rop1, essentiell. Auf der Pflanzenoberfläche wird Rop1 interessanterweise nicht mehr benötigt und sowohl *prf1*-Expression als auch alle Schritte der pathogenen Entwicklung können auch in Rop1 Nullmutanten beobachtet werden [BREFORT *et al.*, 2005]. Dies legt nahe, dass *U. maydis* bereits auf der Oberfläche Signale perzipieren kann. Ziel dieser Arbeit war es, diese pflanzlichen Stimuli zu identifizieren. Nach Identifizierung der Stimuli sollte ein *in vitro* System etabliert werden um die Signaltransduktionskaskaden, die an der Weiterleitung dieser Stimuli beteiligt sind, zu identifizieren und dieses *in vitro* System einzusetzen, um mittels Transkriptomanalyse Änderungen der Genexpression in der frühen Phase der pathogenen Differenzierung zu erfassen.

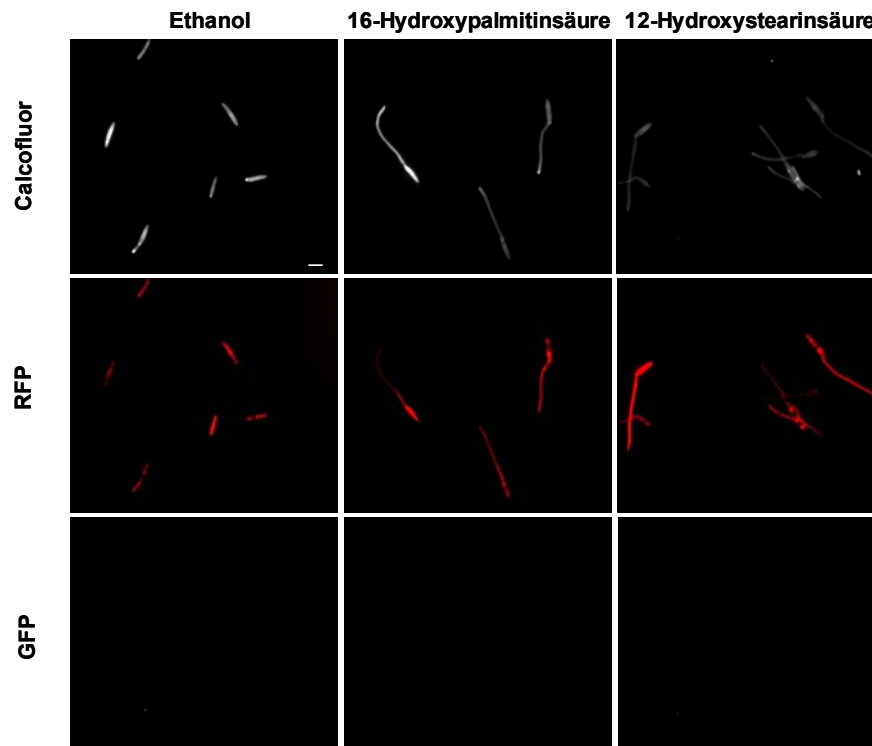
## 2 Ergebnisse

### 2.1 Chemische Signale induzieren distinkte morphologische Differenzierung

In vorhergehenden Arbeiten von Klose *et al.* (2004) und Klose und Kronstad (2006) konnte gezeigt werden, dass Lipide und bestimmte Detergenzien Filamentbildung in diploiden und haploiden *U. maydis* Stämmen induzieren. Nach ausgedehnten Inkubationszeiten von bis zu 5 Tagen entwickeln sich unter nährstofflimitierten Bedingungen septierte, mit Zytoplasma gefüllte Filamente. Die Autoren spekulierten, dass die so induzierten Filamente die Situation während des biotrophen Wachstums in der Pflanze widerspiegeln [KLOSE *et al.*, 2004]. In der vorliegenden Arbeit waren hingegen die frühen Stadien der Differenzierung auf der Blattoberfläche von Interesse, sowie die Stimuli, die zur Induktion dieser Entwicklung führen.

16 bis 24 Stunden nach Spritzinfektion von Maispflanzen mit *U. maydis* beobachtet man auf der Pflanzenoberfläche Filament- und Appressorienbildung. Um die hierfür notwendigen Signal zu identifizieren, wurden die Hauptbestandteile des pflanzlichen Cutins, 12-Hydroxystearinsäure und 16-Hydroxypalmitinsäure [KOLATTUKUDY, 2001; LEQUEU *et al.*, 2003] auf ihre Fähigkeit hin getestet, diese Differenzierungsschritte *in vitro* auszulösen.

Es ist beschrieben, dass *U. maydis* verschiedene Filamenttypen ausbilden kann. Zum einen kann in haploiden Zellen durch kompatibles Pheromon die Bildung von kurzen, mit Zytoplasma gefüllten Konjugationshyphen induziert werden [SPELLIG *et al.*, 1994], zum anderen kommt es nach der Fusion kompatibler Paarungstypen auf der Pflanzenoberfläche zur Ausbildung von *b*-abhängigen, septierten Filamenten, bei denen nur das vorderste Segment Zytoplasma enthält [SNETSELAAR UND MIMS, 1992]. Um zwischen beiden Arten von Filamenten unterscheiden zu können, wurde ausgehend von SG200AM1 ein Stamm generiert, der zytoplasmatisch RFP unter Kontrolle durch den konstitutiven *otef* Promotor exprimiert (SG200AM1-RFP). Die nach Behandlung mit Hydroxy-Fettsäuren in Flüssigkultur gebildeten Filamente waren unseptiert und vollständig mit Zytoplasma gefüllt, was sich durch die Calcofluor- Färbung, sowie durch das in den Hyphen akkumulierte RFP zeigte (Abb. 5).



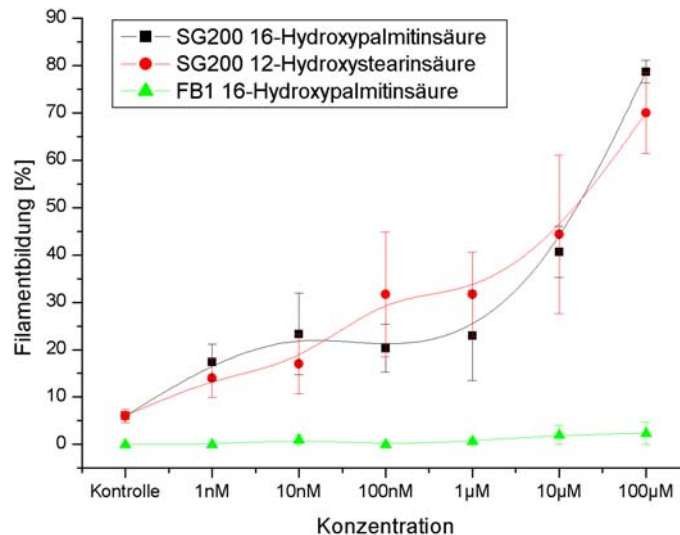
**Abbildung 5: Inkubation mit Hydroxy-Fettsäuren induziert die Bildung von unseptierten, mit Zytoplasma gefüllten Filamenten.**

SG200AM1-RFP wurde, wie in der Legende zu Abbildung 5. beschrieben inkubiert, mit Calcofluor gefärbt und mittels Epifluoreszenzmikroskopie untersucht. Die mit Calcofluor gefärbte pilzliche Zellwand ist zu sehen (oberes Panel) Der RFP-Kanal zeigt zytoplasmatisch exprimiertes RFP (mittleres Panel) und die Expression des AM1-Markers konnte nicht beobachtet werden (unteres Panel). Der Maßstabsbalken (10  $\mu\text{m}$ ) bezieht sich auf alle Panele.

Morphologisch zeigten die durch Fettsäurezugabe induzierten Filamente die gleichen Merkmale, wie Konjugationshyphen. Da jedoch kein entsprechender molekularer Marker für dieses Entwicklungsstadium verfügbar ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei diesen Strukturen um eine andere Art von Filament, beispielsweise stressinduzierte Filamente, handelt.

Um die Effizienz der Filamentbildung zu quantifizieren, wurden die jeweiligen Stämme in Flüssigmedium (2% YEPSL) mit 1 nM bis 100  $\mu\text{M}$  12-Hydroxystearinsäure bzw. 16-Hydroxypalmitinsäure inkubiert (siehe Material und Methoden). Diese Experimente wurden in je drei Wiederholungen durchgeführt, wobei jeweils 100 Zellen mikroskopisch analysiert wurden. Als Lösungsmittelkontrolle diente 1% (v/w) Ethanol. Haploide FB1 Zellen zeigten nach Behandlung mit 16-Hydroxypalmitinsäure keine morphologische Veränderung. Im solopathogenen

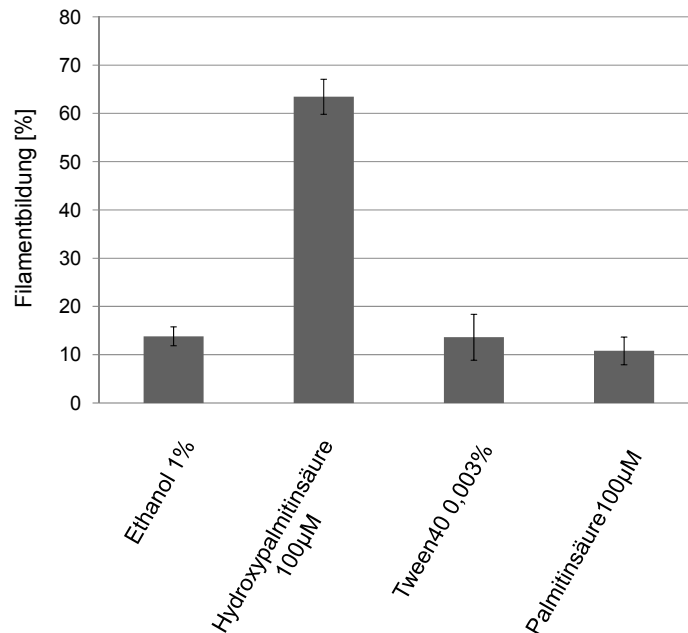
Stamm SG200 hingegen konnte eine dosisabhängige Filament-, jedoch keine Appressorienbildung, beobachtet werden (Abb. 6).



**Abbildung 6: Hydroxy-Fettsäuren induzieren Filamentbildung.** SG200 und FB1 wurden bei 28°C unter langsamem Rollen für 20 h in 2% YEPSL mit den angegebenen Fettsäurekonzentrationen inkubiert (siehe Material und Methoden). Die Ausgangs-Zelldichte lag dabei bei OD<sub>600</sub>:0,2. Ethanol wurde als Lösungsmittel für beide Fettsäuren benutzt und diente daher als Kontrolle. Mindestens 100 Zellen pro Experiment wurden mikroskopisch auf Filamentbildung hin analysiert. Die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten und der Standardfehler sind gezeigt.

Eine maximale Induktion von 70 % (12-Hydroxystearinsäure) bis 80 % (16-Hydroxypalmitinsäure) war bei der höchsten hier gezeigten Konzentration von 100 µM bei beiden Hydroxy-Fettsäuren zu beobachten. Diese Konzentration wurde daraufhin für die nachfolgenden Experimente verwendet. Höhere Konzentrationen, als die beschriebenen führten zu einer Inhibition der Filamentbildung (nicht gezeigt).

Der von Klose *et al.* (2006) beschriebene Effekt auf die Morphologie von *U. maydis* durch Zugabe von Tween40 konnte nach fünftägiger Inkubationszeit beobachtet werden (nicht gezeigt). Um zu untersuchen ob unter den hier etablierten Bedingungen vergleichbare Effekte beobachtet werden, wurden SG200 Zellen mit 1% Ethanol (v/w) als Lösungsmittelkontrolle, mit 100 µM 16-Hydroxypalmitinsäure als Positivkontrolle, 0,003% Tween40 bzw. 100 µM Palmitinsäure behandelt. Weder Tween40 noch Palmitinsäure konnten nach einer kurzen Inkubationszeit von 20 Stunden die Filamentbildung induzieren. Die Inkubation mit 16-Hydroxypalmitinsäure führte hingegen zur Filamentbildung (Abb. 7).



**Abbildung 7: Weder Palmitinsäure noch Tween40 induzieren nach Kurzzeitinkubation Filamentbildung in SG200.**

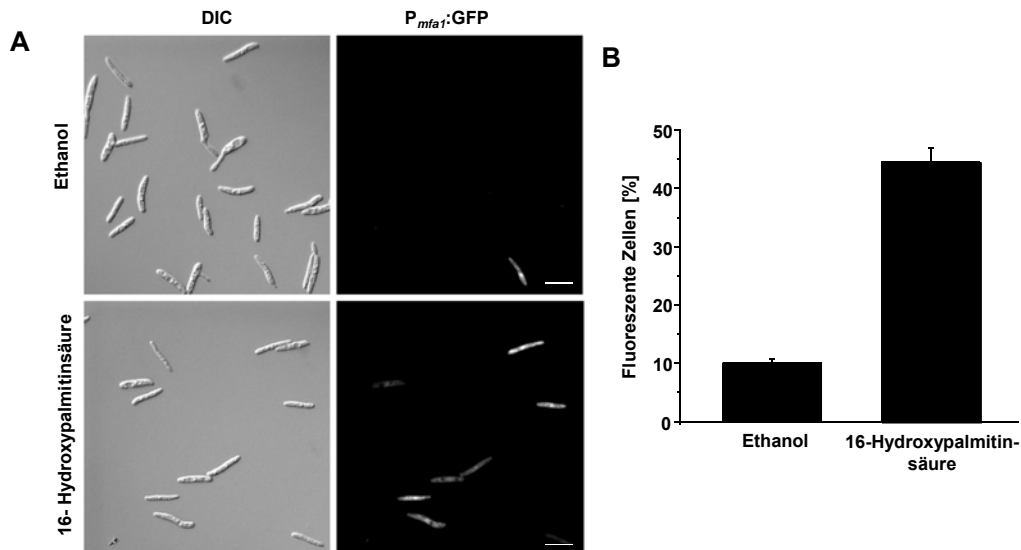
SG200 wurde wie in der Legende zu Abbildung 6. beschrieben mit den angegebenen Fettsäuren inkubiert. Ethanol wurde als Lösungsmittel für die Fettsäuren benutzt und diente daher als Kontrolle. Die Proben wurden auf Filamentbildung hin untersucht und mindestens 100 Zellen pro Experiment wurden mikroskopisch auf Filamentbildung hin analysiert. Die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten und der Standardfehler sind gezeigt.

## 2.2 Hydroxy-Fettsäuren aktivieren die Pheromon-abhängige Signaltransduktion

Da die durch Hydroxy-Fettsäuren induzierten Filamente Merkmale von Konjugationshyphen aufwiesen, wurde untersucht, ob es eine Verbindung zwischen der Wirkung von Hydroxy-Fettsäuren und pheromonabhängiger Filamentbildung gibt. Dafür wurde der Effekt von Hydroxy-Fettsäuren auf die Expression des Gens *mfa1*, das für eine Vorstufe des *U. maydis* Pheromons codiert, beobachtet. Es wurde ein Derivat des haploiden FB1-Stammes benutzt, das GFP unter der Kontrolle des *mfa1* Promoters exprimiert [KAFFARNIK *et al.*, 2003].

Die Behandlung dieses Stammes mit 16-Hydroxypalmitinsäure führte, verglichen mit einer Probe die nur das Lösungsmittel Ethanol enthielt, zu einer vier- bis fünffach erhöhten Zahl an Zellen, die den *mfa1*:GFP Reporter exprimierten (Abb. 8). Dies

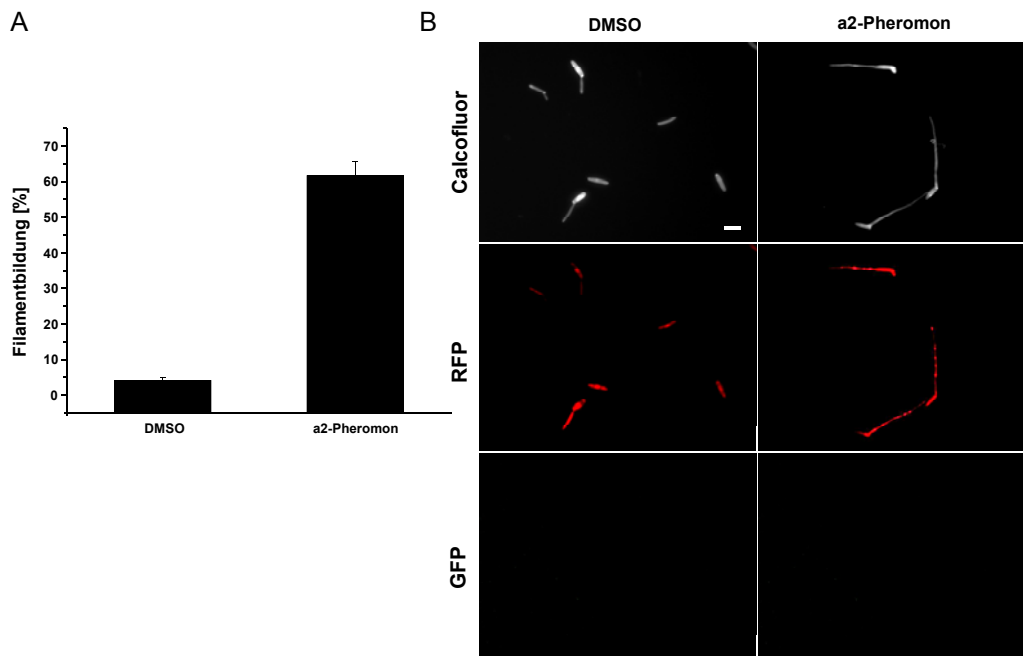
zeigte, dass 16-Hydroxypalmitinsäure *mfa1* Genexpression aktiviert. Im solopathogenen Stamm SG200 sollte dies zu einer Erhöhung der Produktion von  $\alpha_2$ - und  $\alpha_1$ -Pheromon führen,  $\alpha_2$ -Pheromon sollte an den Pra1 Rezeptor binden, so die Pheromon-abhängige Signaltransduktion aktivieren und die Filamentbildung induzieren.



**Abbildung 8: Hydroxy-Fettsäuren induzieren das Pheromon-Gen *mfa1*.**

(A) FB1P<sub>mfa</sub>:GFP wurde 20 h in 2% YEPSL mit entweder 1% Ethanol als Lösungsmittelkontrolle oder 100  $\mu$ M 16-Hydroxypalmitinsäure inkubiert. Danach wurden die Zellen mittels differentieller Interferenzkontrast- (DIC) und Epifluoreszenzmikroskopie untersucht um Expression von GFP zu ermitteln, das unter Kontrolle des *mfa1* Promoters exprimiert wird. Maßstabsbalken: 20  $\mu$ m. (B) Der Anteil der Zellen, die GFP über dem Hintergrundniveau exprimieren, wurde quantifiziert. Das Experiment wurde hierzu in Triplikat durchgeführt und mindestens 150 Zellen wurden pro Experiment analysiert. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

Mit Zytoplasma gefüllte unseptierte Filamente die nach Behandlung der Zellen mit Hydroxy-Fettsäuren beobachtet wurden könnten somit durch Aktivierung der Pheromon-abhängigen Signaltransduktion entstanden sein. Dies wurde durch ein Experiment, indem SG200AM1-RFP mit  $\alpha_2$ -Pheromon behandelt wurde, unterstützt (Abb. 9). In Flüssigmedium zeigte dieser Stamm Wachstum durch Knospung. Durch Zugabe von kompatibelem  $\alpha_2$ -Pheromon konnte hingegen die Bildung von mit Zytoplasma gefüllten Hyphen induziert werden (Abb. 9 B), die morphologisch nicht von den durch 16-Hydroxypalmitinsäure induzierten zu unterscheiden waren (Abb. 6, mittleres Panel).



**Abbildung 9: Pheromonstimulation von SG200AM1-RFP führt zur Bildung von Konjugationshyphen-ähnlichen Strukturen.**

SG200AM1-RFP Zellen wurden für 20 h in 2% YEPSL entweder in Gegenwart von 0,1% DMSO als Lösungsmittelkontrolle oder  $2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$  synthetischem a2-Pheromon inkubiert.

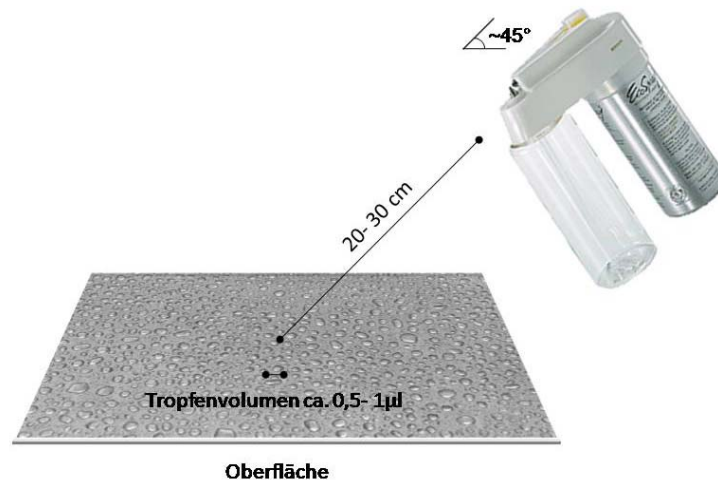
**(A)** Die Anzahl der filamentösen Zellen wurde mikroskopisch ausgewertet. In jedem Experiment wurden 200 Zellen analysiert. Das Experiment wurde in Triplikat durchgeführt. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

**(B)** Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von Calcofluor gefärbten SG200AM1-RFP Zellen zeigen undifferenzierte Zellen nach DMSO Behandlung. Diese Zellen waren mit Zytoplasma gefüllt und exprimierten RFP (linkes Panel). Die mit a2-Pheromon behandelten Zellen bildeten Konjugationshyphen, die vollständig mit Zytoplasma gefüllt sind (rechtes Panel). Unter diesen Bedingungen konnte die Expression des AM1-Markers nicht beobachtet werden, (GFP, unteres Panel). Maßstabsbalken: 10  $\mu\text{m}$ .

### 2.3 Kontakt zu hydrophoben Oberflächen induziert die Bildung von septierten Filamenten

Pflanzliche Oberflächen sind durch Auflagerung cuticulärer Wachse sehr hydrophob. Um eine mögliche Rolle dieser physikalischen Eigenschaft in der frühen Interaktion von *U. maydis* mit seiner Wirtspflanze *Z. mays* zu untersuchen, wurde *U. maydis* auf verschiedene künstliche hydrophobe Oberflächen aufgebracht. Glas diente als hydrophile Referenzoberfläche. Um eine möglichst homogene Auftragung zu erzielen, wurden die Zellen auf die gewünschte Konzentration eingestellt und in dem jeweilig zu testenden Medium aufgenommen. Danach wurde die Zellsuspension

mittels eines Druckluftsprühgerätes (EcoSpray, Labo Chimie, Frankreich; Abb.10) auf die jeweilige Oberfläche aufgebracht. Es wurde in einem Winkel von ca.  $45^\circ$  in einem Abstand von 20 bis 30 cm gesprüht (Abb. 10). Dabei wurde darauf geachtet, dass die Tropfen ein Volumen von ca.  $1\ \mu\text{l}$  nicht überschritten, damit ein effizienter Gasaustausch im gesamten Tropfen gewährleistet war. Um die Tropfen während der folgenden Inkubation vor dem Austrocknen zu bewahren, erfolgte die nachfolgende Inkubation in einer rechteckigen Petrischale (Greiner, Deutschland), die mit destilliertem Wasser getränktes Filterpapier enthielt.



**Abbildung 10: Schematische Darstellung einer Sprüh-Inokulation von Oberflächen.**

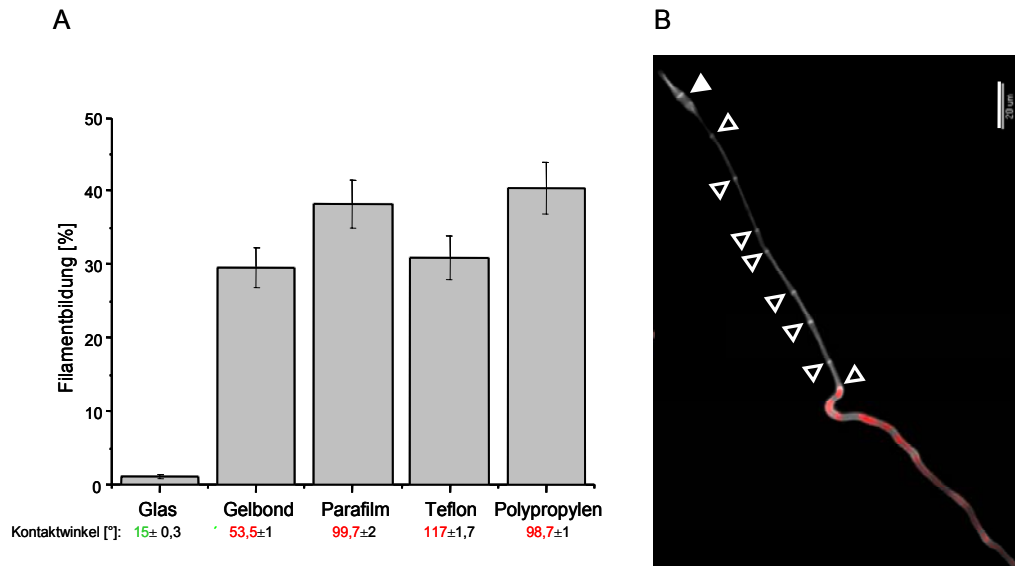
Die jeweilige Oberfläche wurde aus einer Entfernung von 20-30 cm und einem Winkel von ca.  $45^\circ$  besprüht, so dass sich Tropfen der zu testenden Pilzsuspension von ca.  $0,5-1\ \mu\text{l}$  Volumen bildeten.

Um den Effekt von unterschiedlichen hydrophoben Oberflächen zu untersuchen, wurde SG200 in 2% YEPSL resuspendiert und mittels Sprüh-Inokulation auf die angegebenen Oberflächen aufgebracht. Zur genaueren Bestimmung der physikalischen Eigenschaften der verwendeten Oberflächen, wurde der Kontaktwinkel bestimmt (siehe Material und Methoden, Abb. 11 A). Die Zellen wurden auf diesen Oberflächen für 20 h bei 100% Luftfeuchte inkubiert (siehe Material und Methoden).

Hierbei konnten auf den hydrophilen Objektträgern (Kontaktwinkel  $15 \pm 0,3^\circ$ ) nur wenige Filamente ( $< 5\%$ ) beobachtet werden. Auf den hydrophoben Oberflächen (hydrophobe Seite von Gelbond, Teflon, Parafilm M, Polypropylen-Folie; alle mit einem Kontaktwinkel  $> 53^\circ$ ) bilden im Gegensatz dazu 30 bis 45% der Zellen Filamente (Abb. 11 A). Um die Morphologie der unter diesen Bedingungen entstandenen Filamente zu untersuchen, wurde der Stamm SG200AM1-RFP



verwendet. Die Filamente waren septiert, Zytoplasma befand sich lediglich in der Zelle, die die Spitze der Hyphe darstellte (Abb. 11 B). Diese Charakteristika konnten sonst nur bei dikaryotischen Hyphen auf der Pflanzenoberfläche [SNETSELAAR UND MIMS, 1992; eigene Beobachtung] und unter bestimmten Kulturbedingungen [BANUETT UND HERSKOWITZ, 1994a] beobachtet werden.



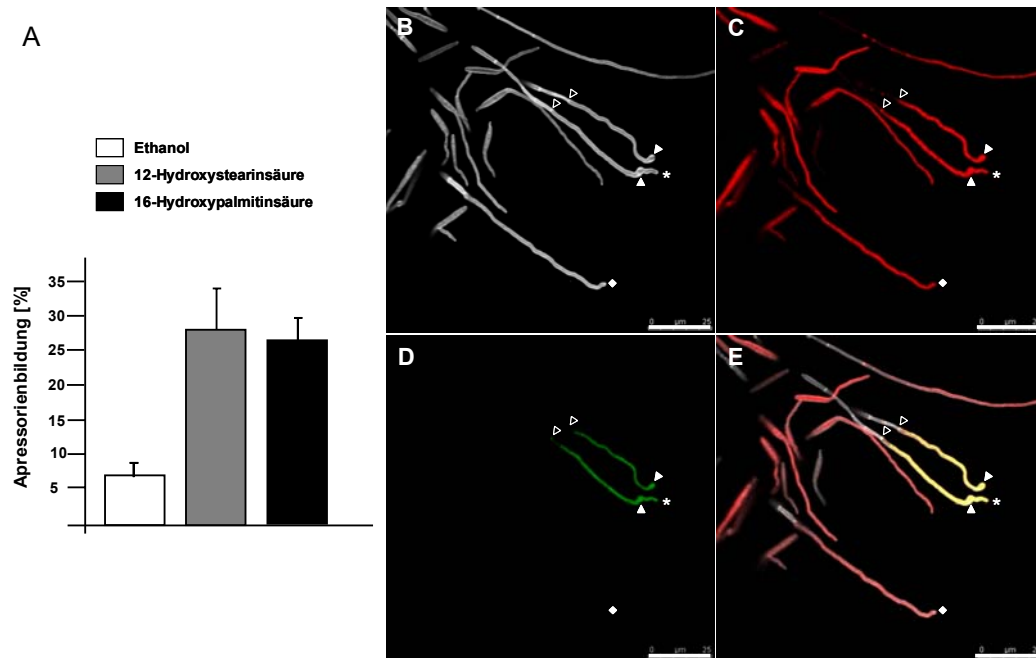
**Abbildung 11: Filamentbildung von *U. maydis* auf hydrophoben Oberflächen**

SG200 (A) und SG200AM1-RFP (B) wurden auf in 2% YEPSL OD<sub>600</sub>:0,2 resuspendiert und auf die jeweiligen Oberflächen aufgesprüht. Nach 20 h Inkubationszeit wurde der Anteil der filamentösen Zellen bestimmt (siehe Material und Methoden). **(A)** Filamentbildung von SG200 auf verschiedenen hydrophoben Oberflächen, Glas diente als hydrophile Kontrolle. Mindestens 100 Zellen wurden pro Experiment analysiert und die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardfehler sind dargestellt. Die Kontaktwinkel als Maß für die Hydrophobizität der Oberflächen sind angegeben (siehe Material und Methoden). **(B)** Morphologische Charakteristika von SG200AM1-RFP auf Parafilm. Die offenen Pfeilspitzen markieren Septen. In älteren Bereichen des Filaments nahe der Sporidie (gefüllte Pfeilspitze) ist der Kollaps der Hyphe sichtbar. Durch Überlagerung von Calcofluor- und RFP-Signal wird deutlich, dass nur das terminale Segment mit Zytoplasma gefüllt ist (Maßstabsbalken: 20 µm).

## 2.4 Eine Kombination aus chemischen Signalen und hydrophober Oberfläche induziert effiziente Appressorienbildung in *U. maydis*

Auf hydrophoben Oberflächen konnte neben der effizienten Induktion von Filamentbildung ebenfalls beobachtet werden, dass etwa 7% der Filamente eine Verdickung der Hyphenspitze zeigten (Abb. 12 A). Dies ging einher mit, verstärkter Färbung durch Calcofluor und Expression des AM1-Markers.

Da beide bisher untersuchten Stimuli unabhängig voneinander Filamentbildung induzierten, wurde eine Kombination beider Stimuli benutzt und dabei die Expression des AM1-Markers in SG200AM1 untersucht. Hierbei zeigte sich, dass auf Parafilm in Anwesenheit von 12-Hydroxystearinsäure 27 % bzw. in Anwesenheit von 16-Hydroxypalmitinsäure 25 % aller Filamente eine terminale Verdickung bildeten und den AM1-Marker exprimierten (Abb. 12 A).



**Abbildung 12. Die Appressorienbildung ist nach Inkubation auf einer hydrophoben Oberfläche in Anwesenheit von Hydroxy-Fettsäuren erhöht.**

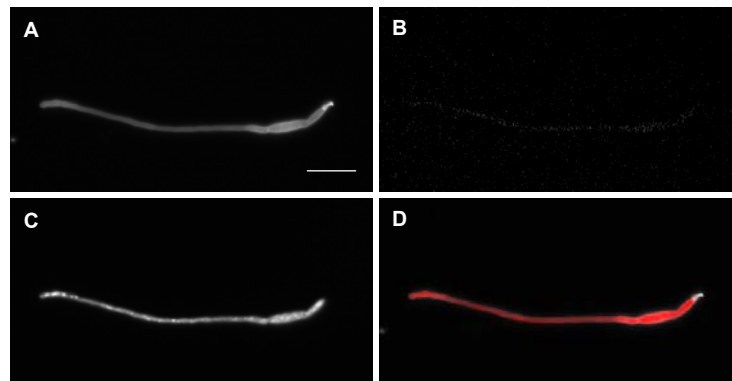
**(A)** Quantifikation der Appressorienbildung mit und ohne Hydroxy-Fettsäuren. SG200AM1 wurde in 2% YEPSL mit bzw. ohne Zugabe von 100  $\mu$ M der angegebenen Hydroxy-Fettsäuren auf Parafilm aufgesprüht. Nach 20 h wurden die Zellen mit Calcofluor gefärbt und mikroskopisch untersucht. Dabei wurden die Filamente in einem Bildausschnitt gezählt und im selben Ausschnitt danach die Zahl der GFP exprimierenden Zellen, die ein Appressorium differenziert hatten, gezählt. Die Zahl der Appressorien wurde in drei unabhängigen Experimenten bestimmt, wobei jeweils mindestens 200 Filamente analysiert wurden. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler.

**(B-E)** Repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen von SG200AM1-RFP auf Parafilm in Anwesenheit von 16-Hydroxypalmitinsäure. Nach 20 h wurden die Zellen mit Calcofluor gefärbt **(B)**, die Expression von zytoplasmatischem RFP **(C)** und der Expression der AM1-Markers (GFP) untersucht **(D)**. **(E)** stellt eine Überlagerung der Kanäle aus **(B)**, **(C)** und **(D)** dar. In dem dargestellten Ausschnitt sind Zellen in verschiedenen Stadien der pathogenen Differenzierung zu sehen: septierte Filamente sind durch offene Pfeile gekennzeichnet, Appressorien durch gefüllte Pfeile, der Stern kennzeichnet ein Filament, das aus einem Appressorium herauswächst, die Raute markiert ein sich entwickelndes Appressorium. Die Maßstabsbalken entsprechen 25  $\mu$ m.

Um zu bestätigen, dass die Expression des AM1- Markers auf diejenigen terminalen Zellen beschränkt ist, die ein Appressorium differenzieren, wurden SG200AM1-RFP Zellen in Anwesenheit von 100  $\mu$ M 16-Hydroxypalmitinsäure auf Parafilm gesprüht. Dabei traten septierte Hyphen auf, bei denen nur die Spitzenzelle mit Zytoplasma

gefüllt war und RFP exprimierte, während in den Spitzenzellen, die ein Appressorium differenzierte sowohl RFP als auch der AM1- Marker exprimiert wurden (Abb. 12 B-E).

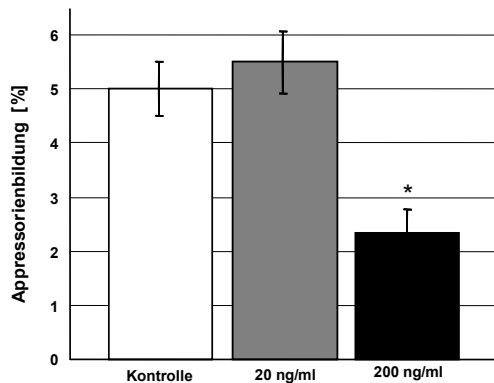
Diese Ergebnisse zeigen, dass die Kombination der beiden Stimuli Hydrophobizität und Hydroxy-Fettsäure eine effiziente Induktion von Appressorienbildung ermöglicht. Auf hydrophile Oberfläche aufgebraute SG200AM1-RFP Zellen, die mit Hydroxy-Fettsäuren behandelt wurden, bildeten lediglich unseptierte, vollständig mit Zytoplasma gefüllte Filamente (Abb. 13). Da der hydrophobe Stimulus bereits alleine zu einem geringen Prozentsatz Appressorienbildung induzierte, ist davon auszugehen, dass der hydrophobe Stimulus essentiell für die Appressorienbildung ist und die Hydroxy-Fettsäuren einen stimulierenden Effekt auf die Appressorienbildung auf hydrophoben Oberflächen haben.



**Abbildung 13: Hydroxy-Fettsäuren sind nicht in der Lage Appressorienbildung auf einer hydrophilen Oberfläche zu induzieren.**

SG200AM1-RFP wurde in 2% YEPSL in Anwesenheit von 100  $\mu$ M 12-Hydroxystearinsäure auf einen Objektträger gesprüht. Nach 20 h Inkubation bei 28°C und 100% Luftfeuchte wurden die Zellen mit Calcofluor gefärbt und mittels Epifluoreszenzmikroskopie untersucht. Die filamentösen Zellen waren nicht septiert und vollständig mit Zytoplasma gefüllt. Eine repräsentative Zelle ist gezeigt. (A) DAPI Filter, (B) GFP Filter, (C) RFP Filter und (D) Überlagerung der Bilder aus (A), (B) und (C). Der Maßstabsbalken (20  $\mu$ m) bezieht sich auf alle Bilder.

Um zu untersuchen, ob die Oberflächenwachse von *Z. mays* die Appressorienbildung von *U. maydis* induzieren können, wurde die Entwicklung von Appressorien in SG200AM1 auf Parafilm mit bzw. ohne Zugabe von einer Wachsemulsion mikroskopisch beobachtet. Dazu wurde zuerst das Oberflächenwachs von etwa 1000 7 Tage alten Maispflanzen gewonnen, mit Wasser gewaschen und mittels Ultraschallbehandlung zu einer Emulsion in Wasser weiterverarbeitet (siehe Material und Methoden). Dabei zeigte sich, dass die Zugabe von 20 ng/ml Wachs keinen Einfluss auf die Appressorienbildung hatte, während die Zugabe von 200 ng/ml einen statistisch signifikanten inhibierenden Effekt hatte (Abb.14).

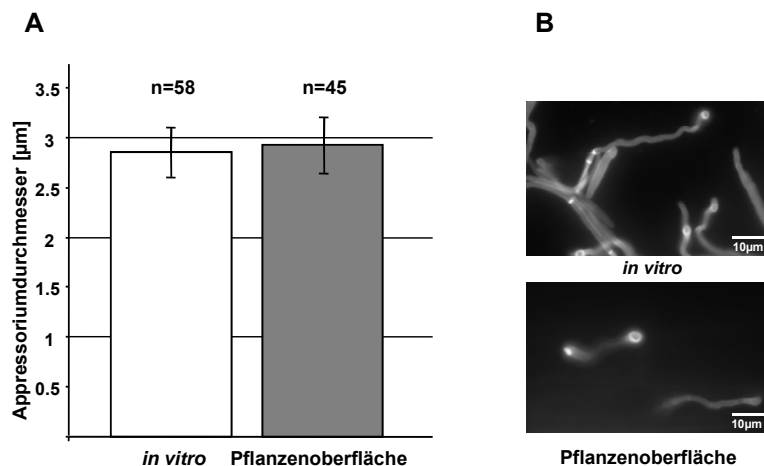


**Abbildung 14: Die Appressorienbildung wird durch Zugabe von cuticulärem Wachs nicht beeinflusst.**

SG200AM1 wurde in 2% YEPSL mit einer wässrigen Emulsion mit cuticulären Wachsen entsprechend der angegebenen Endkonzentrationen versetzt. Wasser diente als Kontrolle. Nach 20 h wurden die Zellen mit Calcofluor gefärbt und die Appressorienbildung, wie in der Legende zu Abbildung 12 beschrieben, quantifiziert. Bei einer Konzentration von 20 ng/ml Wachs war kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle

festzustellen ( $p=0,55$ ). Bei einer Wachskonzentration von 200 ng/ml wurde eine signifikante (\* $p=0,0016$ ) Reduktion in der Appressorienbildung beobachtet.

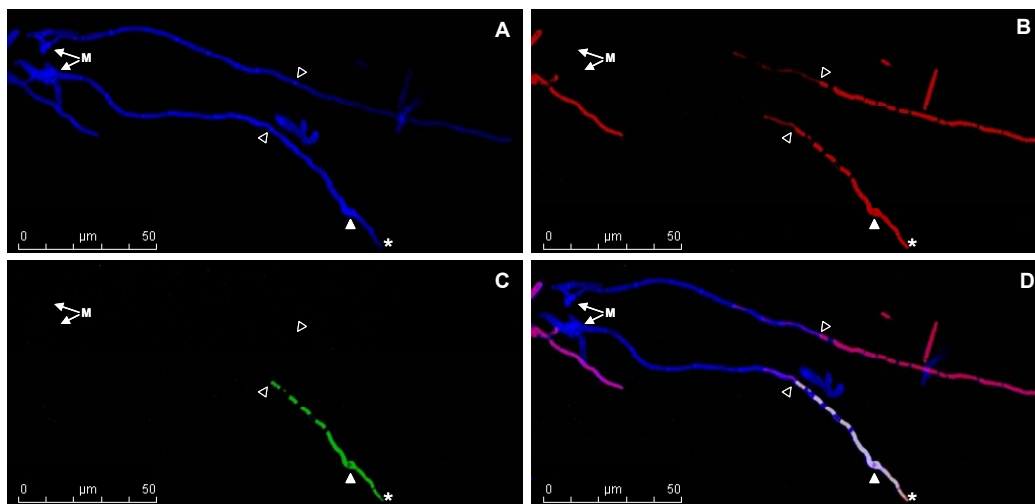
Die *in vitro* induzierten Appressorien waren morphologisch nicht von den auf der Pflanze gebildeten Strukturen zu unterscheiden (Abb. 15 B). Es wurden mikroskopische Aufnahmen von 58 Appressorien unter *in vitro* Bedingungen und 45 Aufnahmen von Appressorien auf der Pflanzenoberfläche gemacht. Die in den Aufnahmen dargestellten Appressorien wurden mittels des Programms MetaMorph (siehe Material und Methoden) vermessen. Hierbei war im Mittel kein Größenunterschied feststellbar (Abb. 15 A), morphologische Unterschiede konnten ebenfalls nicht beobachtet werden (Abb. 15 B).



**Abbildung 15: *In vitro* gebildete Appressorien und auf der Pflanzenoberfläche gebildete Appressorien haben den gleichen Durchmesser.**

SG200AM1 wurde in 2% YEPSL in Anwesenheit von 100  $\mu\text{M}$  16-Hydroxypalmitinsäure auf Parafilm inkubiert oder in  $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert und in 7 Tage alte Maissetzlinge injiziert. Nach 20 h wurden die Zellen mit Calcofluor gefärbt und mittels Epifluoreszenzmikroskopie untersucht. Dabei wurden Aufnahmen von Appressorien gemacht, die den AM1-Marker exprimierten und anschließend mittels MetaMorph der Durchmesser bestimmt (**A**), wobei n der Zahl der analysierten Appressorien entspricht. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. (**B**) Beispiele von *in vitro* induzierten und auf der Blattoberfläche gebildeten Appressorien. Der Maßstabsbalken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

Um zu prüfen, ob es unter den beschriebenen *in vitro* Bedingungen zur Fusion kompatibler Sporidien kommt, wurden zweipatible haploide Stämme verwendet. Der Stamm FB1 enthielt den AM1-Marker (FB1AM1) und der Stamm FB2 exprimierte konstitutiv RFP unter Kontrolle des *otef* Promoters (FB2RFP). Die Zellen beider Stämme wurden in 2% YEPSL gemischt und in Anwesenheit von 16-Hydroxypalmitinsäure auf Parafilm aufgesprüht. Nach 20 h hatten sich dikaryotische Filamente, sowie Appressorien gebildet. Dabei wurde die Expression des AM1-Markers wiederum nur in solchen Zellen beobachtet, die morphologisch erkennbar Appressorien ausgebildet hatten (Abb. 16).



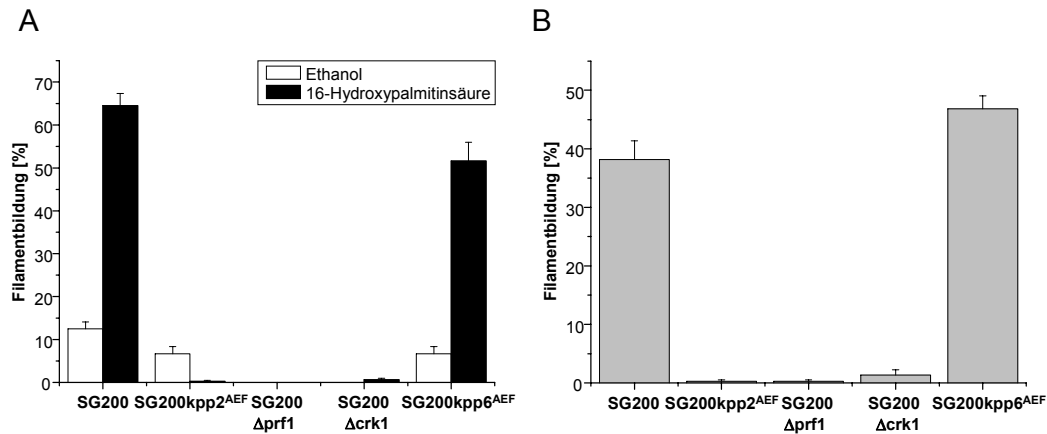
**Abbildung 16: Der AM1-Marker wird auch in dikaryotischen Filamenten, die ein Appressorium differenzieren, exprimiert.**

FB1AM1 wurde mit FB2RFP gemischt und in Anwesenheit von 16-Hydroxypalmitinsäure, wie in der Legende zu Abb. 12. beschrieben, auf Parafilm gesprüht. Nach 20 h wurden die Zellen mit Calcofluor gefärbt und mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. In (A) ist das Calcofluor Signal dargestellt, in (B) zytoplasmatische RFP Expression, in (C) die Expression des AM1-Markers und in (D) eine Überlagerung aller Kanäle. In dem dargestellten Bildausschnitt zeigen die Zellen verschiedenen Entwicklungsstadien: Paarung kompatibler Zellen ist mit (M) markiert, septierte Filamente sind durch offene Pfeile gekennzeichnet, Appressorien durch gefüllte Pfeile, der Stern kennzeichnet ein Filament, das aus einem Appressorium herauswächst, nachdem die Parafilm-Oberfläche nicht durchdrungen werden konnte.

## 2.5 Die Pheromon-aktivierbaren MAPK Kaskade ist essentiell für die morphologische Antwort auf Hydroxy-Fettsäuren und Hydrophobizität

Nachdem Hydroxy-Fettsäuren sowie Hydrophobizität der Oberfläche als die wesentlichen Stimuli für die Auslösung der frühen Phase der pathogenen Differenzierung identifiziert werden konnten, sollten nun die Signalwege identifiziert werden, über die diese Reize verarbeitet werden. Die MAPK Kpp2 wurde bereits als essentiell für die Filamentbildung nach Pheromonstimulation und für die Bildung von Appressorien beschrieben [MÜLLER *et al.*, 2003]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die MAPK Crk1 entscheidend für Paarungskompetenz und morphologische Differenzierung ist. Der Deletionsphänotyp von *crk1* lässt sich allerdings durch Expression des Transkriptionsfaktors Prf1 komplementieren [GARRIDO UND MARTIN, 2003; GARRIDO *et al.*, 2004]. Eine weitere MAPK, Kpp6, wird für die Funktion der Appressorien benötigt [BRACHMANN *et al.*, 2003]. Diese bereits beschriebenen Signaltransduktionskomponenten wurden auf ihre Rolle in der Weiterleitung der Oberflächenstimuli hin untersucht. Da die MAPK Kpp2 und Kpp6 funktionell redundant sind [BRACHMANN *et al.*, 2003], wurden anstelle von Deletionsmutanten *U. maydis* Stämme verwendet, in denen das endogene *kpp2* bzw. *kpp6* Gen Mutationen tragen (AEF), die die Aktivierung der Mutantenproteine verhindern [BRACHMANN *et al.*, 2003; MÜLLER *et al.*, 2003]. Die verschiedenen Stämme wurden in der Folge wie bereits beschrieben entweder in 2% YEPSL in Anwesenheit von 100 µM 16-Hydroxypalmitinsäure inkubiert, oder im gleichen Medium auf Parafilm aufgesprüht.

SG200kpp6<sup>AEF</sup> war unter beiden getesteten Bedingungen in der Lage, Filamente auszubilden und verhielt sich wie der Ausgangsstamm SG200. Im Gegensatz dazu waren SG200kpp2<sup>AEF</sup>, SG200Δcrk1 und SG200Δprf1 nicht in der Lage, auf den Fettsäurestimulus bzw. den Oberflächenstimulus zu reagieren (Abb. 17). Dies legt den Schluss nahe, dass dieser Zweig der MAPK-Kaskade intakt sein muss, um eine Integration beider Stimuli zu gewährleisten.



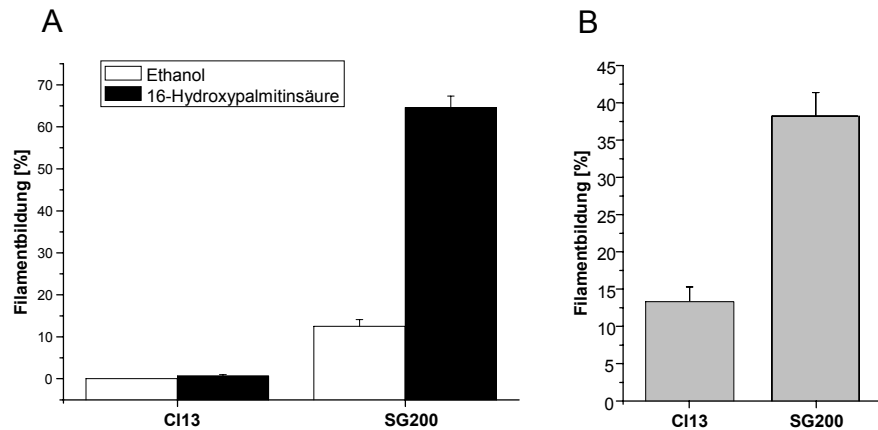
**Abbildung 17: Filamentbildung als Antwort auf Hydroxy-Fettsäure- und hydrophoben Stimulus ist von der Integrität der Pheromon-aktivierbaren MAPK-Kaskade abhängig.**

Die angegebenen Stämme wurden in 2% YEPSL aufgenommen und unter Zugabe von 100  $\mu$ M 16-Hydroxypalmitinsäure in Flüssigmedium **(A)** oder ohne Zugabe von Fettsäure auf Parafilm **(B)** 20h inkubiert und lichtmikroskopisch auf Filamentbildung untersucht. Der Mittelwert der Anzahl der gebildeten Filamente ist angegeben. Die Experimente wurden in Triplikat durchgeführt wobei in jedem Versuch mindestens 100 Zellen untersucht wurden. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Um zu untersuchen, ob die Filamentbildung von der vorherigen Bildung von Pheromon abhängig ist, wurden die Reaktionen von SG200 mit der von CI13 verglichen. CI13 trägt, wie SG200, einen hybriden *b*-Locus, der bE1 und bW2 exprimiert. Der *a1*-Locus ist hingegen unverändert. SG200 aus CI13 hervorgegangen, enthält aber zusätzlich das *mfa2* Gen im *a1*-Locus, dessen Genprodukt das kompatible  $\alpha$ 2-Pheromon ist, das durch die Bindung an den Pra1-Rezeptor eine autokrine Pheromonstimulation ermöglicht. Da CI13 nur den unveränderten *a1*-Locus besitzt, kann nur das zu Pra1 inkompatible  $\alpha$ 1-Pheromon produziert werden. Damit ist in diesem Stamm keine autokrine Pheromonstimulation möglich.

In SG200, nicht jedoch in CI13, konnte die Bildung von mit Zytoplasma gefüllten Hyphen nach Zugabe von 100  $\mu$ M 16-Hydroxypalmitinsäure beobachtet werden (Abb.18 A). Auf dem hydrophoben Parafilm bildeten etwa 38% der SG200 Zellen Filamente, für CI13 dagegen lag die Rate bei 11% (Abb. 18 B). Ein morphologischer Effekt von 16-Hydroxypalmitinsäure konnte also nur im Stamm SG200 beobachtet werden, in dem autokrine Pheromonstimulation möglich ist. Der hydrophobe Stimulus konnte in beiden Stämmen Filamentbildung induzieren, wenn auch mit reduzierter Effizienz in CI13 verglichen mit SG200. Dies deutet auf einen additiven Effekt der autokrinen Pheromonstimulation auf die Filamentbildung hin. Der Vergleich zwischen SG200 und SG200Kpp2<sup>AEF</sup> zeigte, dass unter den hier etablierten *in vitro*

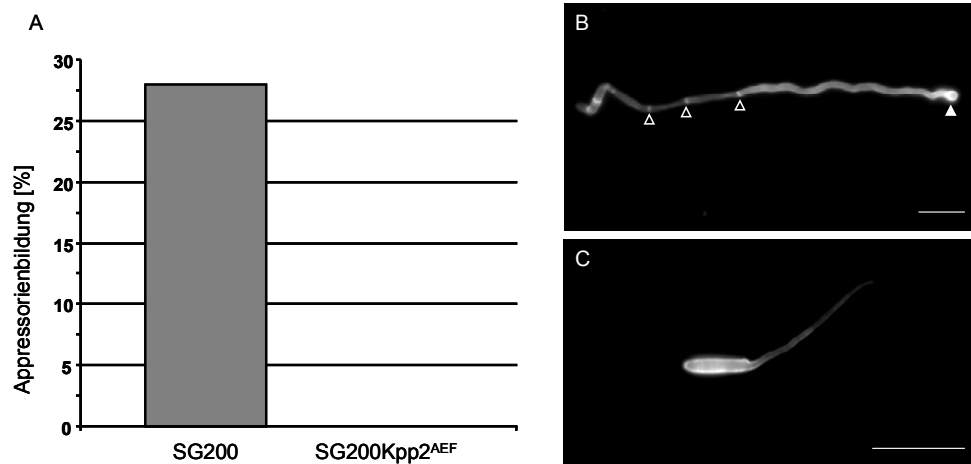
Bedingungen die Phosphorylierung der MAPK Kpp2 essentiell für die Filamentbildung ist (Abb. 17).



**Abbildung 18: Autokrine Pheromonstimulation ist essentiell für die morphologische Antwort auf den Hydroxy-Fettsäurestimulus, jedoch nicht für die Filamentbildung auf hydrophober Oberfläche.**

CI13 und SG200 wurden wie in der Legende zu Abb. 17 beschrieben für 20 h in Flüssigmedium (A) oder auf Parafilm (B) inkubiert und lichtmikroskopisch auf Filamentbildung hin untersucht. Die Experimente wurden in Triplikat durchgeführt, wobei in jedem Versuch mindestens 100 Zellen untersucht wurden. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an.

Nun wurde der Einfluss von Kpp2 auf die Appressorienbildung hin untersucht, und es zeigte sich, dass die wenigen von SG200Kpp2<sup>AEF</sup> gebildeten Filamente weder Septierung noch die Bildung einer stark durch Calcofluor gefärbten, terminalen Verdickung aufwiesen, wie sie in SG200 zu sehen war (Abb. 19 und C).

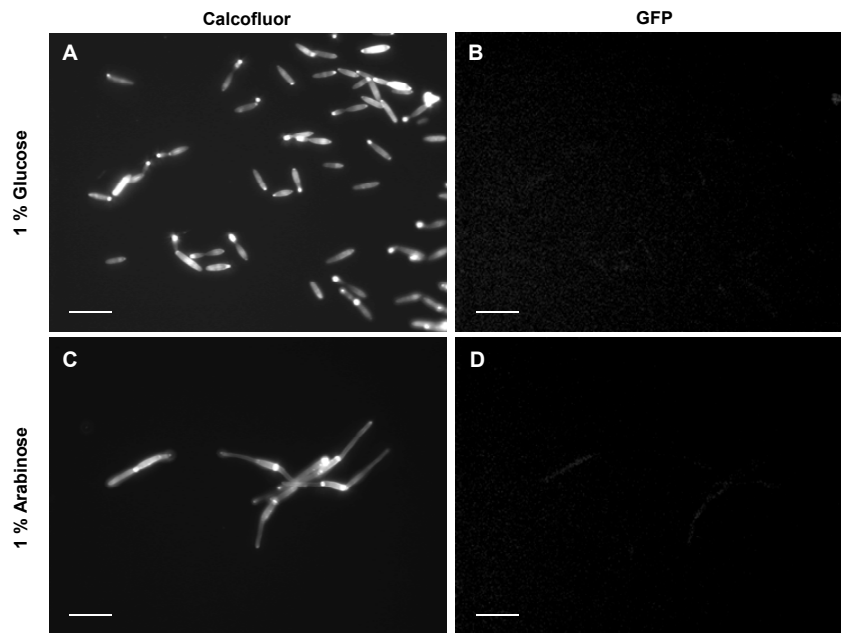


**Abbildung 19: Die Appressorienbildung benötigt ein aktivierbares *kpp2*-Allel.**

Die angegebenen Stämme wurden bei OD<sub>600</sub>:0,2 in 2% YEPSL resuspendiert und auf Parafilm gesprüht. Nach 20 h Inkubationszeit wurden die Präparate mit Calcofluor gefärbt und die Appressorienbildung mikroskopisch, durch Zählen der stark gefärbten Schwellungen in den Spitzenzellen im Verhältnis zu der Gesamtzahl der Hyphen, quantifiziert (A). 100 Filamente wurden pro Stamm gezählt. In SG200 konnte die Bildung von septierten Filamenten (B, offene Pfeile) und Appressorien beobachtet (B, gefüllte Pfeile) werden. Dagegen konnte in SG200Kpp2<sup>AEF</sup> nur vereinzelt die Bildung von dünnen, unseptierten Filamenten beobachtet werden (C), die in keinem Fall zur Bildung eines Appressoriums führten. Maßstabsbalken in B und C: 20 µm.



Um zu prüfen, ob allein die genetische Aktivierung der MAPK Kpp2 zur Ausbildung von Appressorien und zur Expression des AM1-Markers ausreicht, wurde ein Stamm verwendet, bei dem die MAPK Kpp2 genetisch durch eine aktive Version der MAPKK Fuz7 (Fuz7DD) aktiviert wird. Die Expression von *fuz7DD* wird dabei durch den *crg1*-Promoter reguliert, der durch Arabinose induziert und bei Anwesenheit von Glukose reprimiert ist [Material und Methoden, MÜLLER *et al.*, 2003]. Um eine mikroskopische Auswertung zu ermöglichen, wurde ein Derivat des Stammes SG200*fuz7DD* [MÜLLER *et al.*, 2003] erzeugt, der eine genomische Integration des AM1-Markers trägt [MENDOZA-MENDOZA *et al.*, 2009a]. Dieser Stamm (SG200FAM1) wurde in CM Medium inkubiert. Nach acht Stunden Induktion mit 1% Arabinose bildeten sich kurze Hyphen, die jedoch weder Appressorienbildung noch Expression des AM1-Markers zeigten (Abb. 20 C und D).



**Abbildung 20: Transkriptionelle Aktivierung der MAPK Kpp2 induziert weder die Bildung von Appressorien noch die Expression des AM1-Markers, wenn die Zellen in Flüssigkultur inkubiert wurden.**

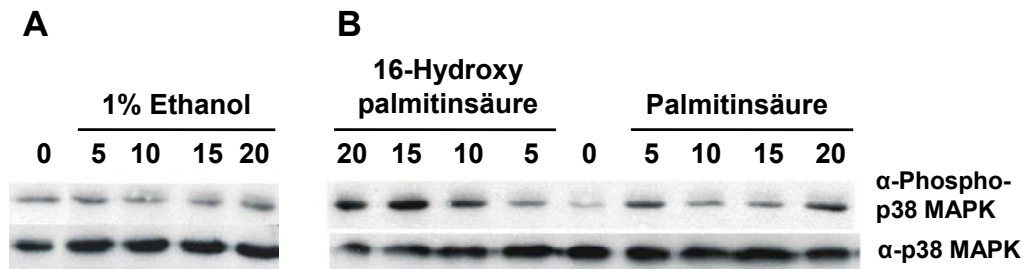
SG200FAM1 wurde für 8 h in CM-Medium mit entweder 1% Glukose (*fuz7DD* aus) oder 1% Arabinose (*fuz7DD* an) inkubiert. Für die mikroskopische Analyse wurden die Zellen mit Calcofluor gefärbt. Ohne Aktivierung der MAPK Kaskade wuchsen die Sporidien weiter und teilten sich, ohne sich zu differenzieren (**A**) und ohne den AM1-Marker zu exprimieren (**B**). Wenn *fuz7DD* Expression induziert wurde, konnte die Bildung von unseptierten Filamenten beobachtet werden (**C**), der AM1-Marker wurde jedoch nicht exprimiert (**D**). Maßstabsbalken: 20 µm.

Diese Hyphen zeigten eine auffällige Morphologie; sie wurden an einem oder beiden Polen der Zelle, die stark mit Calcofluor gefärbt waren, gebildet, wiesen jedoch keine Septen auf. Ohne Aktivierung von Kpp2 konnte keine morphologische Veränderung

der Zellen festgestellt werden, jedoch fiel auch hier eine starke Calcofluor-Färbung eines der beiden Pole der Zellen auf (Abb. 20 A und B). Dies zeigt, dass allein die Expression des konstitutiv aktiven *fuz7*-Allels (*fuz7DD*), und damit die Aktivierung von Kpp2, nicht ausreicht, um die Expression des AM1-Markers bzw. die Bildung von Appressorien zu induzieren.

## **2.6 Hydroxy-Fettsäuren induzieren eine Phosphorylierung der MAP-Kinase Hog1**

Um mehr über die Wirkungsweise der Hydroxy-Fettsäuren zu erfahren, wurde eine Analyse bezüglich der Aktivierung verschiedener MAP-Kinasen in *U. maydis* durchgeführt. Dazu wurden Zellen von SG200 in 2% YEPSL mit je 100  $\mu$ M 16-Hydroxypalmitinsäure, Palmitinsäure und 1% Ethanol als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Nach Inkubationszeiten von 0, 5, 10, 15 und 20 min wurden jeweils Proben für eine Proteinpräparation (siehe Material und Methoden) genommen. Die gewonnen Extrakte wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließenden für einen Western-Blot verwendet (siehe Material und Methoden). Die Detektion mit  $\alpha$ -Phospho-p42/44 MAP-Kinase Antikörpern [siehe Material und Methoden; MÜLLER *et al.*, 2003] ergab keine erkennbare Phosphorylierung der MAP-Kinasen Kpp2 und Kpp6 (nicht gezeigt). Die Detektion mit einem  $\alpha$ -Phospho-p38 MAP-Kinase Antikörpern zeigte hingegen eine Phosphorylierung der MAP-Kinase Hog1 nach Exposition der Zellen mit 16-Hydroxypalmitinsäure, wogegen keine Phosphorylierung nach Exposition mit Ethanol und kein konsistenter Anstieg der Phosphorylierung nach Behandlung mit Palmitinsäure festgestellt werden konnte (Abb. 21). Lediglich in der Probe, die nach fünf Minuten genommen wurde, lässt sich ein Anstieg der Menge von phosphoryliertem Hog1 erkennen, der jedoch, im Gegensatz zu der mit 16-Hydroxypalmitinsäure behandelten Probe, nach zehn bzw. 15 Minuten nicht mehr zu beobachten war.

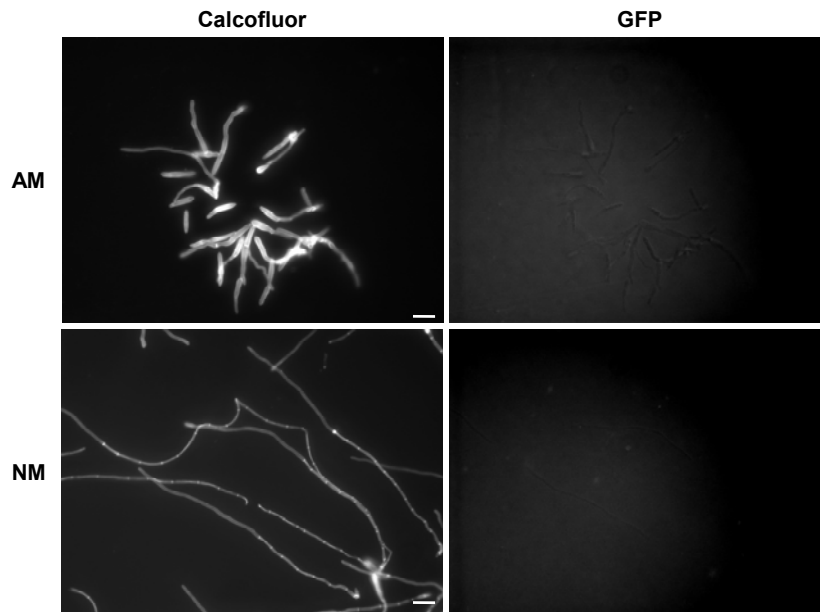


**Abbildung 21: 16-Hydroxypalmitinsäure induziert die Phosphorylierung der p38-MAP-Kinase Hog1 in *U. maydis*.**

Analyse des Phosphorylierungsstatus der MAP-Kinase Hog1 in SG200 nach Behandlung mit (A) Ethanol als Lösungsmittelkontrolle, (B) 16-Hydroxypalmitinsäure und Palmitinsäure. Je ein Aliquot von 10 µg Gesamtproteinextrakt jeder Probe wurden pro Spur auf zwei SDS-Gele geladen. Die Western-Blots wurden mit α-phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) Rabbit mAb bzw. α-p38 MAPK Mouse mAb hybridisiert.

## 2.7 Aktivierung der *b*-abhängigen Genexpression ist nicht ausreichend für die Appressorienbildung

Die Rolle der Aktivierung des bE/bW Heterodimers in der Appressorienbildung wurde unter Verwendung des Stammes AB33AM1 untersucht. In diesem Stamm wird ein kompatibles bE1/bW2 Heterodimer unter der Kontrolle eines Nitrat-induzierbaren *nar1*-Promoters exprimiert [BRACHMANN *et al.*, 2001]. Weiter wurde, wie zuvor beschrieben, der AM1-Marker in den *ip*-Lokus integriert (siehe Material und Methoden). Die Expression von bE/bW reicht in Flüssigkultur bereits aus, um *b*-abhängige Filamentbildung beobachten zu können [BRACHMANN *et al.*, 2001]. Dieses monokaryotische Filament weist alle Merkmale des filamentösen Dikaryons auf: apikales Spitzenwachstum, Kernmigration, sowie die Bildung von Septen und leeren Hyphensegmenten [STEINBERG *et al.*, 1998]. Die AB33AM1 Zellen wurden für 20 Stunden auf Parafilm mit und ohne Nitrat-Induzierte Expression des bE1/bW2 Heterodimers inkubiert. Hierbei konnte in den Zellen, die das bE1/bW2 Heterodimer exprimieren, wie erwartet, die Bildung von septierten Filamenten beobachtet werden, Appressorienbildung wurde jedoch nicht beobachtet (Abb. 22). In den Zellen, in denen das bE1/bW2 Heterodimer nicht exprimiert wurde, konnten nur kurze, unseptierte Filamente beobachtet werden.



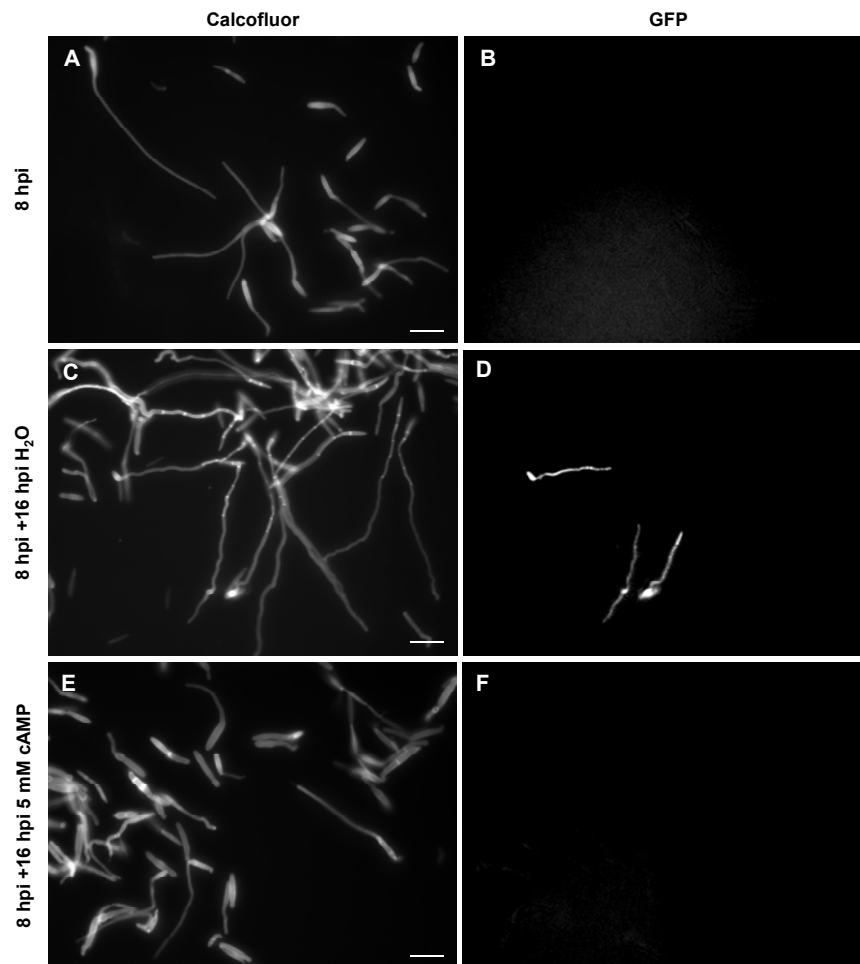
**Abbildung 22: Die Expression des bE1/bW2 Heterodimers in AB33AM1 führt auf Parafilm nicht zur Bildung von Appressorien.**

AB33AM1 wurde in AM bzw. NM mit 2% YEPSL auf OD<sub>600</sub>:0,2 eingestellt und mittels Sprühhinokulation auf Parafilm aufgebracht. Nach 20 h Inkubationszeit wurden die Präparate mit Calcofluor gefärbt und mikroskopisch auf Filamentbildung und Expression des AM1-Markers hin untersucht. Maßstabsbalken: 20 µm.

## 2.8 Exogenes cAMP inhibiert Filament- und Appressorienbildung *in vitro*

Nachdem die Expression von *mfa1* auch durch Zugabe von cAMP induziert werden kann [KRÜGER *et al.*, 1998], wurde der Effekt von cAMP auf die Differenzierung von SG200AM1 auf Parafilm untersucht. Dazu wurden Zellen auf Parafilm aufgesprüht, acht Stunden inkubiert und mikroskopisch untersucht (Abb. 23 A und B). Anschließend wurden 5 mM cAMP bzw. Wasser als Lösungsmittelkontrolle nachgesprüht. Nach weiteren 16 Stunden Inkubationszeit wurde die Expression des AM1-Markers und die Morphologie der Zellen mikroskopisch untersucht (Abb. 23 C-F). Es stellte sich heraus, dass bei der hier verwendeten cAMP Konzentration die Filamentbildung gestoppt wurde, d.h. es fand keine weitere Elongation der Filamente statt; es konnte keine Appressorienbildung beobachtet werden. Da durch externe Zugabe von 5 mM cAMP die morphologischen Defekte von Mutanten, die in der cAMP Signaltransduktion gestört sind, komplementiert werden konnten [GOLD *et al.*, 1994; KRÜGER *et al.*, 1998], ist es unwahrscheinlich, dass cAMP eine verstärkende

Rolle in dem beobachteten Differenzierungsprozess auf der hydrophoben Oberfläche spielt.



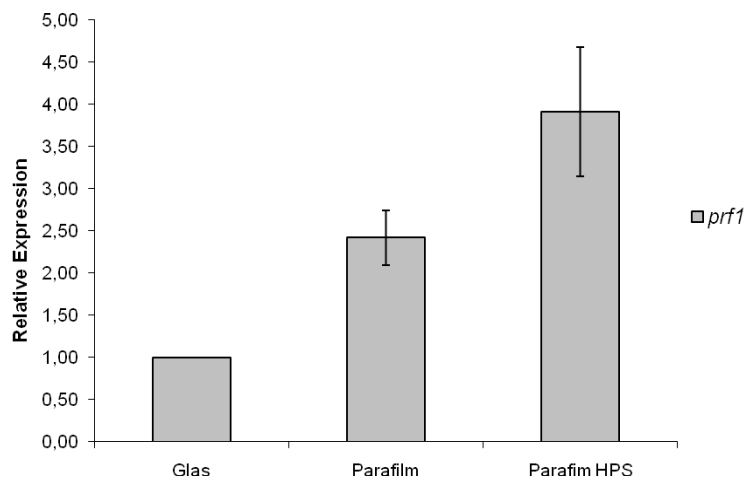
**Abbildung 23: cAMP unterdrückt Filament- und Appressorienbildung *in vitro*.**

SG200AM1 wurde bei  $OD_{600}$ :0,2 in 2% YEPSL resuspendiert und auf Parafilm gesprüht. Nach 8 h wurde eine Probe mit Calcofluor gefärbt und mikroskopisch untersucht. Nach dieser Zeit beginnen die Zellen filamentös zu wachsen und an der Oberfläche zu adherieren (**A**). Expression des AM1-Markers konnte nicht beobachtet werden (**B**). Nach 8 h Inkubation wurde je eine Probe mit Wasser bzw. einer 10 mM cAMP Lösung besprüht. Die mit Wasser besprühten Zellen bildeten septierte Filamente und Appressorien (**C**) und zeigten die Expression des AM1-Markers (**D**). Die mit cAMP behandelten Zellen wurden in Filamentbildung arretiert, bildeten keine Appressorien (**E**) und exprimierten den AM1-Marker nicht (**F**). Maßstabsbalken in allen Panels: 20  $\mu$ m.

## 2.9 Hydrophobizität und Hydroxy-Fettsäuren induzieren die Expression des Transkriptionsfaktors *prf1*

In den vorherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Integrität der Pheromon-abhängigen MAPK Kaskade essentiell für die Integration der Stimuli ist.

Weiter konnten KAFFARNIK *et al.* (2003) zeigen, dass eine Aktivierung dieser Kaskade den Transkriptionsfaktor Prf1 aktiviert, der dann die Transkription seiner Zielgene und seine eigene Transkription induziert [BREFORT *et al.*, 2005]. Daher war es interessant zu prüfen, ob die beiden hier charakterisierten Stimuli in SG200 die Expression von *prf1* induzieren können. Dazu wurde SG200 auf Glas bzw. Parafilm aufgesprüht. Ein Aliquot wurde vorher mit 16-Hydroxypalmitinsäure (HPS) versetzt und auf Parafilm gesprüht, ein Aliquot wurde jeweils mit Ethanol als Lösungsmittelkontrolle versetzt und auf Glas bzw. Parafilm aufgesprüht. Die so behandelten Zellen wurden, nach 6 Stunden Inkubation, geerntet und die RNA isoliert, zu cDNA umgeschrieben und als Template in eine quantitative Real-Time PCR eingesetzt (siehe Material und Methoden).



**Abbildung 24: Real-Time Analyse der *prf1* Expression in SG200.** SG200 wurde bei OD<sub>600</sub>: 1 in 2% YEPSL resuspendiert, mit Hydroxypalmitinsäure (HPS) bzw. Ethanol als Lösungsmittelkontrolle versetzt und auf Glas bzw. Parafilm gesprüht. Nach 6 h Inkubation wurde die Gesamt-RNA isoliert. Aus diesen Proben hergestellte cDNA diente als Ausgangsmaterial für die quantitative RealTime PCR. Eine erhöhte Expression von *prf1* konnte auf Parafilm beobachtet werden. Eine weitere Erhöhung der *prf1* Expression konnte in Anwesenheit von HPS beobachtet werden. Das konstitutiv exprimierte *ppi*-Gen diente in allen Real-Time Analysen als Kontrolle. Das Experiment wurde in Triplikat durchgeführt, der Standardfehler ist gezeigt. Der Expressionswert auf Glas diente als Referenz und wurde in jedem Experiment gleich 1 gesetzt, daher konnte hier kein Fehler angegeben werden.

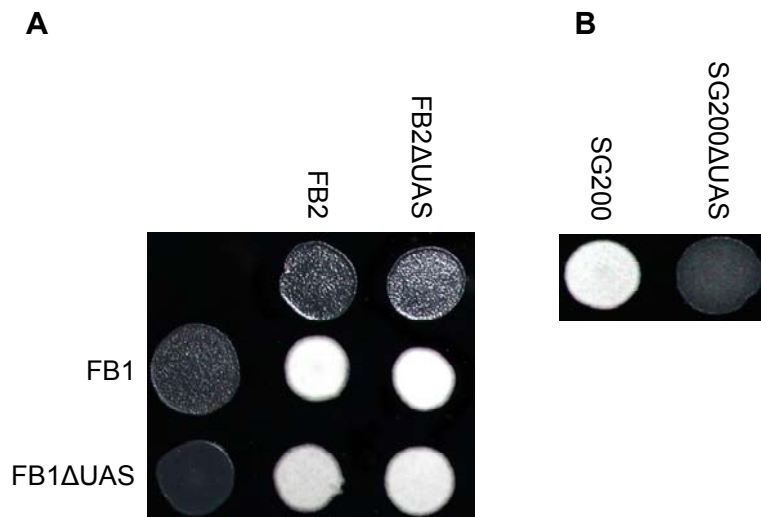
Verglichen mit den auf Glas inkubierten Zellen zeigte sich ein Expressionsanstieg von *prf1* auf das 2,5-fache in den SG200 Zellen die auf Parafilm inkubiert wurden, (Abb. 24). Wurden die Zellen parallel beiden Stimuli ausgesetzt, erhöhte sich die relative Expression weiter auf das etwa 4-fache der Expression auf Glas (Abb. 24).

## **2.10 Das UAS-Element spielt nur im solopathogenen Stamm SG200 eine Rolle in der Kontrolle der pathogenen Differenzierung**

Es konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass das distale regulatorische UAS-Element im *prf1*-Promotor für die Transkription von *prf1* essentiell ist und in Abhängigkeit von Kohlenstoffquelle und Nährstoffangebot reguliert wird [HARTMANN *et al.*, 1996, 1999]. Die UAS wurde kartiert, indem eine *prf1*-Deletionsmutante mit frei replizierenden Plasmiden komplementiert wurde, die *prf1* mit verschiedenen langen Bereichen des Promotors trugen [HARTMANN *et al.*, 1999]. Die MAPK Crk1 ist für die UAS-abhängige transkriptionelle Aktivität des *prf1*-Promotors und für die Transkription von *prf1* nötig [GARRIDO *et al.*, 2004]. Um zu überprüfen, ob die UAS auch an der *prf1*-Transkription als Antwort auf die hier identifizierten pflanzlichen Stimuli beteiligt ist, wurden zunächst FB1, FB2 und SG200 Stämme hergestellt, bei denen die 85 bp der UAS durch eine Nourseothricin-Resistenzkassette ersetzt und somit im Locus deletiert war (siehe Material und Methoden).

Die so erzeugten Stämme FB1 $\Delta$ UAS und FB2 $\Delta$ UAS auf Aktivkohle-haltigen PD-Platten gekreuzt (siehe Material und Methoden). Überraschenderweise war keine Beeinträchtigung der Paarungskompetenz feststellbar (Abb. 25 A); d.h. in allen Fällen konnte die Bildung von Dikaryen in Form von weißem Luftmycel beobachtet werden.

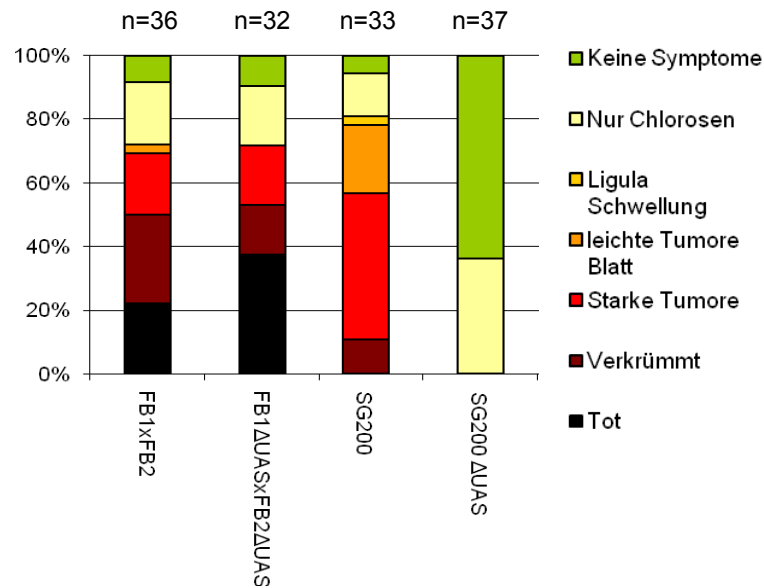
SG200 besitzt die Fähigkeit zur autokrinen Pheromonstimulation (vgl. Kapitel 2.2.). Dies bewirkt, dass der Stamm SG200 ohne vorherige Fusion mit einem Partner auf aktivkohlehaltigen Agarplatten filamentös wächst (Abb. 25 B). SG200 $\Delta$ UAS war jedoch nicht mehr in der Lage, Filamente auszubilden. Dies deutet an, dass die UAS in SG200 für die autokrine Pheromonstimulation benötigt wird.



**Abbildung 25: Kreuzungsverhalten von  $\Delta$ UAS-Mutanten (A)** Die links aufgegebenen Stämme sind FB1 (a1 b1) und die entsprechende  $\Delta$ UAS-Mutante. Die oben aufgegebenen Stämme sind FB2 (a2 b2) und die entsprechende  $\Delta$ UAS-Mutante. Sie wurden entweder alleine (linke bzw. obere Reihe) oder in Mischung mit den kompatiblen Stämmen auf PD-Aktivkohlemedium aufgetropft und 48 h bei 28°C inkubiert. **(B)** SG200 und die entsprechende  $\Delta$ UAS-Mutante wurden alleine aufgetropft und wie in (A) beschrieben inkubiert.

Als nächstes wurde die Pathogenität der Stämme untersucht (siehe Material und Methoden). Dazu wurden sieben Tage alte Setzlinge der Maislinie „Early Golden Bantam“ entweder mit einer kompatiblen Mischung von FB1 und FB2 oder entsprechend mit FB1 $\Delta$ UAS und FB2 $\Delta$ UAS infiziert. Der solopathogene Stamm SG200 und der entsprechende Deletionsstamm SG200 $\Delta$ UAS wurden alleine inokuliert. Die FB1 $\Delta$ UASxFB2 $\Delta$ UAS Kreuzung entwickelte Symptome, die mit der FB1xFB2 Kreuzung vergleichbar waren (Abb. 26). Mit SG200 wurde eine Tumorraten von nahezu 80% beobachtet, während SG200 $\Delta$ UAS keine Symptome induzierte. Das hier gezeigte Ergebnis konnte mit je einer weiteren unabhängigen Mutante bestätigt werden (nicht gezeigt).

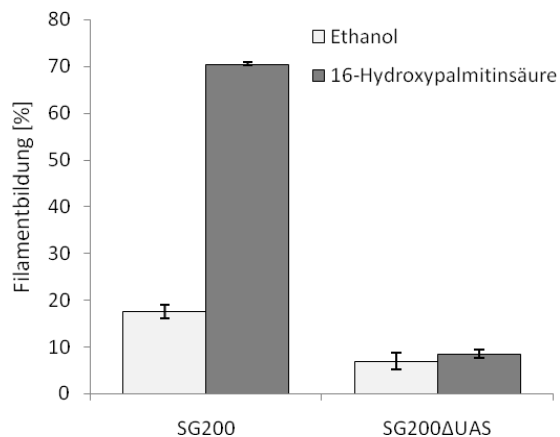




**Abbildung 26: Die Deletion des UAS Elements im *prf1*-Promotor von SG200 verhindert die pathogene Entwicklung.** Beurteilung der durch *U. maydis* hervorgerufenen Symptome an Early Golden Bantam Maispflanzen 12 Tage nach Infektion mit einer Mischung der *U. maydis* Stämmen FB1 und FB2 bzw. FB1ΔUAS und FB2ΔUAS und SG200 bzw. SG200ΔUAS. Die Zahl der infizierten Pflanzen ist unter n angegeben.

Nachdem lediglich die Deletion der UAS in SG200 einen Phänotyp zeigte, wurden zuerst die *prf1*-Promotorregionen von FB1, FB2 und SG200 hinsichtlich ihrer Sequenz überprüft. Hierbei konnte jedoch kein Unterschied zwischen den drei Stämmen festgestellt werden (nicht gezeigt).

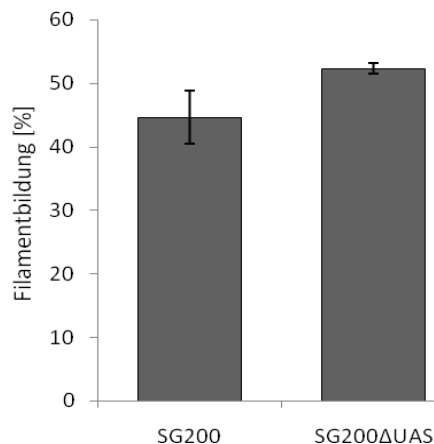
Da sich bereits in dem Experiment auf Aktivkohlehaltigen PD-Platten andeutete, dass die endokrine Pheromonstimulation in SG200ΔUAS gestört ist, wurde als nächstes getestet, ob SG200ΔUAS nach Stimulation mit Hydroxy-Fettsäuren Filamente bilden kann.



**Abbildung 27: Die Stimulation mit 16-Hydroxypalmitinsäure induziert keine Filamentbildung in SG200ΔUAS.** SG200 und SG200ΔUAS wurden wie in der Legende zu Abb. 5. beschrieben mit 100μM 16-Hydroxypalmitinsäure bzw. Ethanol als Lösungsmittelkontrolle für 20 h inkubiert. Die dargestellten Werte repräsentieren den Mittelwert von 3 Experimenten; pro Experiment wurden 100 Zellen analysiert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

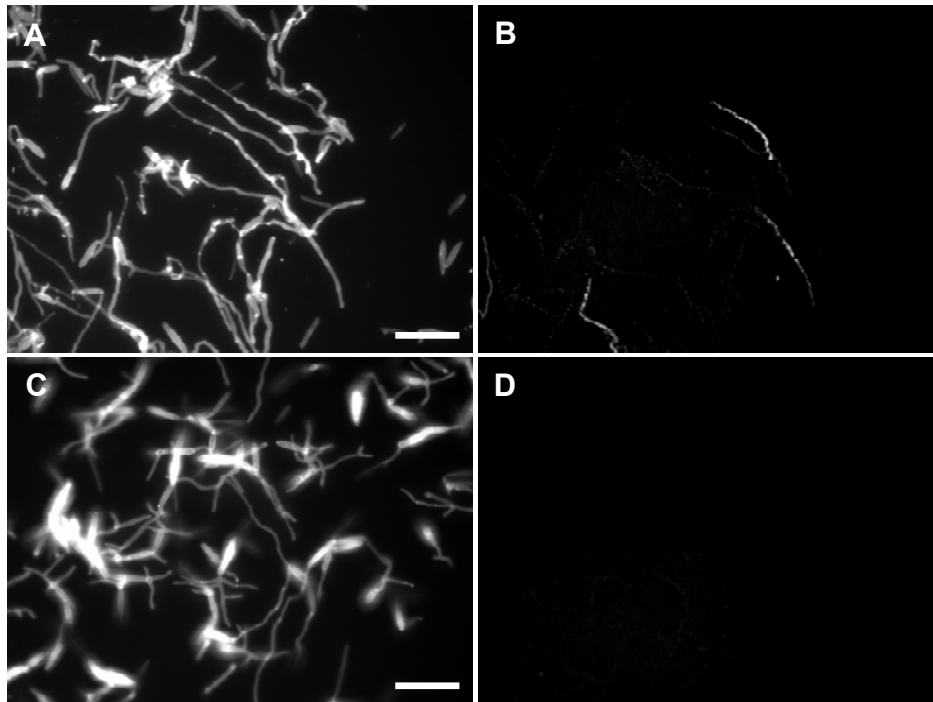
Um dies zu prüfen, wurde SG200 $\Delta$ UAS, wie zuvor beschrieben, mit 16-Hydroxypalmitinsäure behandelt. SG200 diente hierbei als Kontrolle. Im Gegensatz zu SG200 war in SG200 $\Delta$ UAS keine Erhöhung der Filamentbildung nach Fettsäurestimulation zu beobachten (Abb. 27).

Die Inkubation von SG200 $\Delta$ UAS für 20 Stunden auf hydrophobem Parafilm zeigte jedoch, dass unter diesen Bedingungen Filamentbildung induziert werden konnte (Abb. 28). Im Mittel bildeten 47% der SG200 Zellen und 54 % der SG200 $\Delta$ UAS Zellen unter diesen Bedingungen Filamente.



**Abbildung 28: Der Kontakt zu einer Hydrophoben Oberfläche induziert Filamentbildung in SG200 $\Delta$ UAS.** SG200 und SG200 $\Delta$ UAS wurden wie in der Legende zu Abb. 11 beschrieben für 20 h auf Parafilm inkubiert. Die dargestellten Werte repräsentieren den Mittelwert von 3 Experimenten; pro Experiment wurden 100 Zellen analysiert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Um als nächstes die Appressorienbildung von SG200 $\Delta$ UAS testen zu können, wurde der AM1-Marker in SG200 $\Delta$ UAS integriert und so der Stamm SG200 $\Delta$ UAS-AM1 generiert. Dieser Stamm und SG200AM1 wurden auf Parafilm in Anwesenheit von Ethanol als Lösungsmittelkontrolle oder 16-Hydroxypalmitinsäure inkubiert wie zuvor beschrieben. Hier zeigte sich, dass die Inkubation auf Parafilm in beiden Stämmen ausreicht, um die Bildung von septierten Filamenten zu induzieren, jedoch im Falle von SG200 $\Delta$ UAS-AM1 in drei unabhängigen Experimenten, in denen jeweils 200 Filamente analysiert wurden keine Bildung von Appressorien beobachtet werden konnte. Zu den von SG200 $\Delta$ UAS-AM1 gebildeten Filamenten ist anzumerken, dass diese oftmals Verzweigungen aufwiesen, während SG200AM1 septierte, unverzweigte Filamente und Appressorien bildete (Abb. 29).

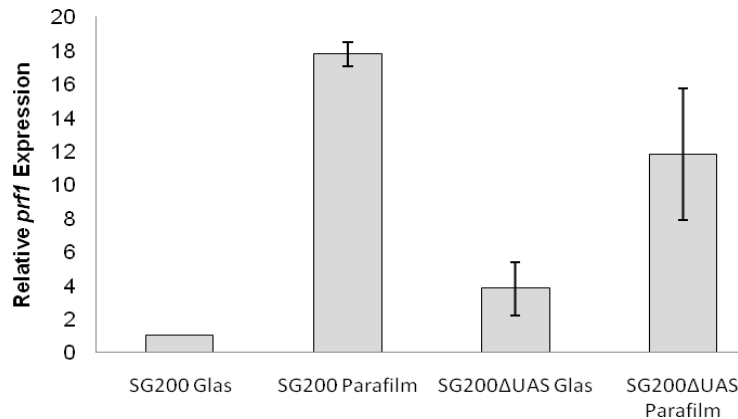


**Abbildung 29: SG200ΔUASAM1 ist nicht in der Lage *in vitro* Appressorien zu differenzieren.** SG200AM1 und SG200ΔUAS-AM1 wurden wie in der Legende zu Abb. 12. beschrieben auf Parafilm aufgebracht und nach 20 h wurden die gebildeten Filamente mittels Calcofluor-Färbung (DAPI-Kanal, A und C) und mit Hilfe des AM1-Markers (GFP-Kanal, B und D) untersucht. Die Bildung von septierten Filamenten (A), sowie Expression des AM1-Markers in Appressorien (B) konnte in SG200AM1 beobachtet werden. SG200ΔUAS-AM1 bildete ebenfalls septierte Filamente (C), exprimierte jedoch den AM1-Marker nicht (D). Die Maßstabsbalken entsprechen 20 µm.

Im Folgenden wurde mittels Real-Time PCR überprüft, ob die Inkubation der Zellen auf der hydrophoben Oberfläche die Expression von *prf1* UAS-abhängig induziert.

Dazu wurden SG200 und SG200ΔUAS-AM1 auf Glas bzw. Parafilm aufgesprüht und die RNA nach 8 Stunden Inkubationszeit isoliert.

Hierbei zeigte sich ein Expressionsanstieg von *prf1* auf das 18-fache in den SG200 Zellen, die auf Parafilm inkubiert wurden, verglichen mit den auf Glas inkubierten Zellen (Abb. 30). In SG200ΔUAS-AM1 zeigte sich im Vergleich zu SG200AM1 eine etwa 3-fach erhöhte *prf1* Expression auf Glas. Auf Parafilm im Vergleich zu Glas konnte eine auf etwa 13-fach erhöhte *prf1* Expression in SG200ΔUAS-AM1 festgestellt werden (Abb. 30). Damit wurde deutlich, dass in SG200 die UAS nicht für die Induktion der Expression von *prf1* nach hydrophobem Stimulus benötigt wurde. Die Expressionswerte auf Parafilm waren in beiden Stämmen nicht signifikant unterschiedlich ( $p=0,21$ ).



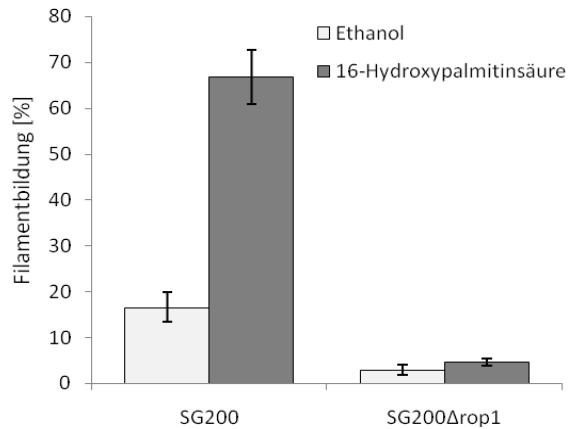
**Abbildung 30: Die *prf1* Expression in SG200ΔUASAM1 kann durch einen hydrophoben Stimulus induziert werden.** SG200 und SG200ΔUASAM1 wurden bei OD<sub>600</sub>:1 in 2% YEPSL resuspendiert und auf Glas bzw. Parafilm gesprüht. Nach 8 h Inkubation wurde die Gesamt-RNA isoliert. Aus diesen Proben hergestellte cDNA diente als Ausgangsmaterial für die quantitative RealTime PCR. Eine Induktion von *prf1* konnte auf dem Parafilm beobachtet werden. Das konstitutiv exprimierte *ppi*-Gen diente in allen Real-Time Analysen als Kontrolle. Das Experiment wurde in Triplikate durchgeführt. Der Standardfehler ist gezeigt, der Expressionswert von SG200 auf Glas diente als Referenz und wurde auf 1 gesetzt.

## 2.11 Hydrophobizität bewirkt Expression von *prf1* in Abwesenheit des Transkriptionsfaktors *rop1*

Der HMG („high-mobility group“) Transkriptionsfaktor Rop1 ist ein direkter Regulator von *prf1* [BREFORT *et al.*, 2005]. Die Deletion von *rop1* führt zu einem Paarungs- und Filamentbildungsdefekt und die Mutanten können nicht mehr auf Pheromon-Stimulation reagieren [BREFORT *et al.*, 2005]. Es konnte gezeigt werden, dass Rop1 in axenischer Kultur für die Pheromon-Induzierte Genexpression essentiell ist und somit auch für die Expression von *prf1*. Interessanterweise sind alle diese Defekte auf der Wirtspflanze nicht zu beobachten. Sowohl Paarungskompetenz als auch Filamentbildung sind wieder hergestellt, und die Pathogenität ist nicht beeinträchtigt. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Pflanzenstimuli existieren, die in Abwesenheit von Rop1 die Expression von *prf1* induzieren können.

Im Folgenden wurde überprüft, ob es sich bei Hydrophobizität und Hydroxy-Fettsäuren um die Stimuli handelt, die die Notwendigkeit von Rop1 umgehen.

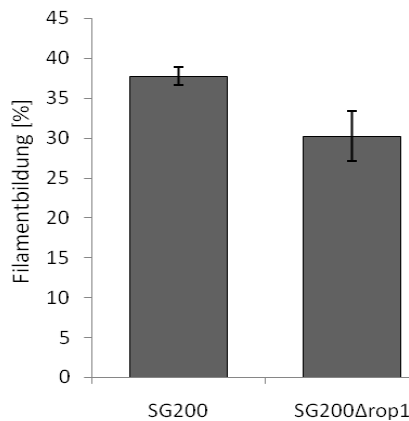
Zuerst wurde SG200Δrop1, wie zuvor beschrieben mit 16-Hydroxypalmitinsäure behandelt. SG200 diente hierbei als Kontrolle. Im Gegensatz zum Kontrollstamm war in SG200Δrop1 keine morphologische Differenzierung zu beobachten (Abb. 31).



**Abbildung 31: Die Stimulation mit 16-Hydroxypalmitinsäure induziert keine Filamentbildung in SG200Δrop1.** SG200 und SG200Δrop1 wurden wie in der Legende zu Abb. 5 beschrieben mit 100μM 16-Hydroxypalmitinsäure bzw. Ethanol als Lösungsmittelkontrolle für 20 h inkubiert. Die dargestellten Werte repräsentieren den Mittelwert von 6 Experimenten; pro Experiment wurden 100 Zellen analysiert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Dieses Ergebnis zeigt, dass Hydroxy-Fettsäuren den Phänotyp von SG200Δrop1 nicht komplementieren können, und es sich somit dabei nicht um das verantwortliche Pflanzensignal handelt.

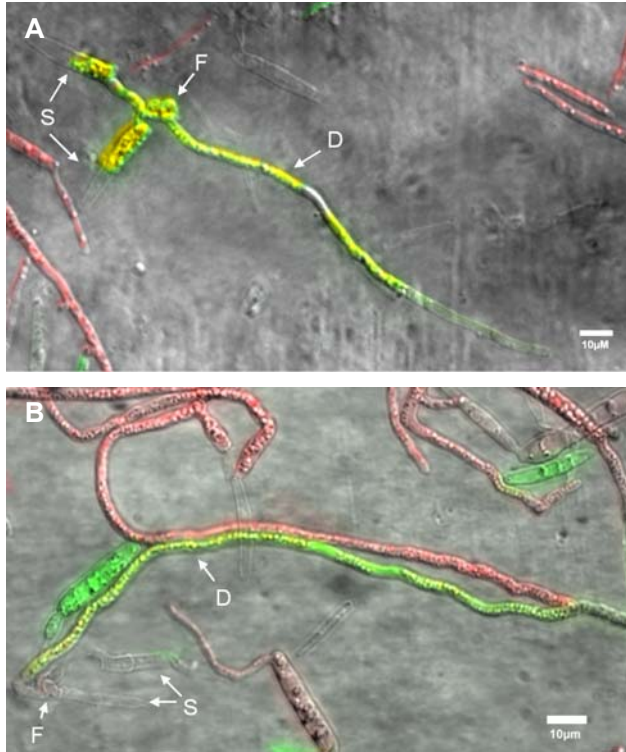
Als nächstes wurde die Filamentbildung von SG200Δrop1 auf Parafilm untersucht. Dazu wurden SG200Δrop1 und SG200 auf Parafilm aufgesprüht und nach 20 Stunden Inkubationszeit der Prozentsatz der Zellen bestimmt, die filamentöses Wachstum zeigten. SG200Δrop1 war unter diesen Bedingungen in der Lage, septierte Filamente zu bilden (siehe auch Abb. 34). Die Filamentbildungsrate lag mit etwa 30% jedoch statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) unter der von SG200 (37%; Abb. 32).



**Abbildung 32: Der Kontakt zu einer Hydrophoben Oberfläche induziert Filamentbildung in SG200Δrop1.** SG200 und SG200Δrop1 wurden wie in der Legende zu Abb. 11 beschrieben für 20 h auf Parafilm inkubiert. Die dargestellten Werte repräsentieren den Mittelwert von 6 Experimenten; pro Experiment wurden 100 Zellen analysiert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

Da die Filamentbildung in SG200Δrop1 auf Parafilm beobachtet werden konnte, lag es nahe anzunehmen, dass der hydrophobe Stimulus der gesuchte Pflanzenstimulus ist, der die *prf1* Expression in Abwesenheit von Rop1 induziert und somit auch die Paarungskompetenz wiederherstellt. Um diese Annahme zu prüfen, wurden die Stämme FB1GFP und FB2RFP, die konstitutiv GFP bzw. RFP unter Kontrolle des *otef* Promotors exprimierten, hergestellt. Analog dazu wurden die Stämme FB1Δrop1GFP und FB2Δrop1RFP hergestellt.

Die Zellen beider Stämme wurden jeweils in 2% YEPSL gemischt und in Anwesenheit von 16-Hydroxypalmitinsäure auf Parafilm aufgesprüht. Nach 20 h hatten sich dikaryotische Filamente gebildet, und es zeigte sich in diesen dikaryotischen Filamenten die Expression beider Fluoreszenzproteine, GFP und RFP, was verdeutlicht, dass diese Struktur dikaryotisch war (Abb. 33).

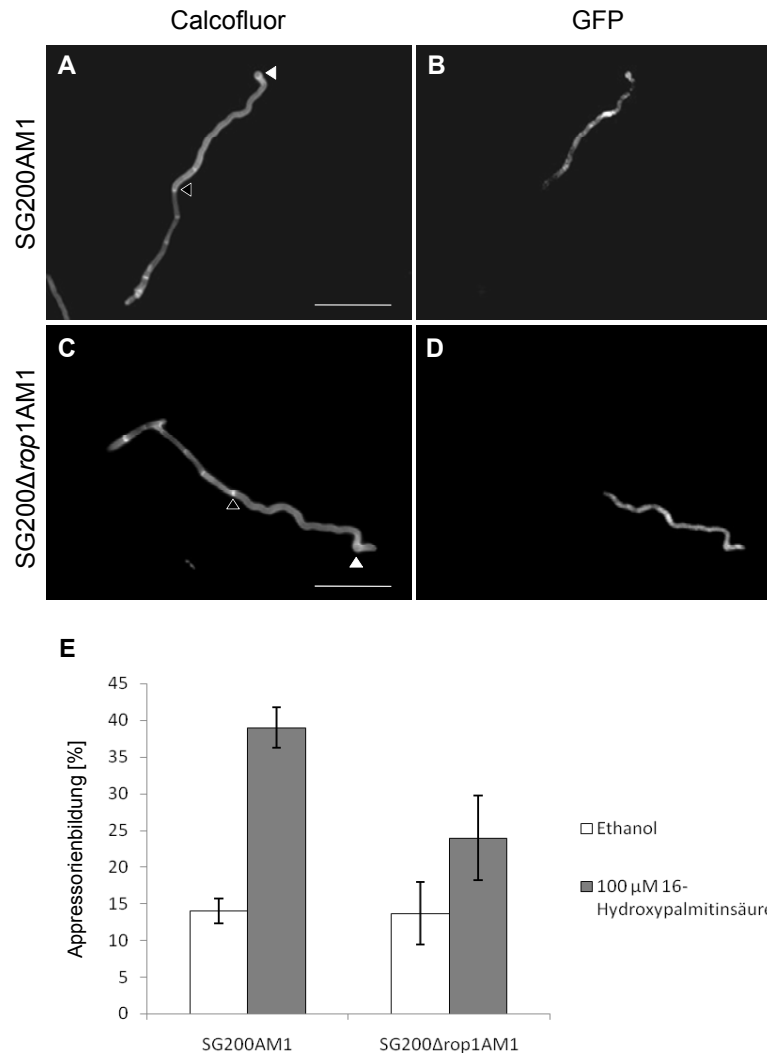


**Abbildung 33: Hydrophobizität und Hydroxy-Fettsäurestimulus komplementieren den Paarungsdefekt der *rop1* Deletionsstämme.**

Überlagerungsaufnahme von DIC, GFP und RFP Kanal. FB1GFP wurde mit FB2RFP (A) und FB1 $\Delta$ rop1GFP FB2 $\Delta$ rop1RFP (B) gemischt und in Anwesenheit von 16-Hydroxypalmitinsäure, wie in der Legende zu Abb. 16 beschrieben, auf Parafilm gesprüht. Nach 20 h wurden die Zellen mikroskopisch untersucht. In beiden Abbildungen ist eine Paarungsreaktion dargestellt. Es sind jeweils die Sporidien (S) zu sehen, der Punkt an dem die Konjugationshyphen fusionieren ist mit (F) markiert. Das resultierende Dikaryon (D) exprimiert beide Fluoreszenzproteine, was in der Überlagerung in Gelb dargestellt ist. Maßstabsbalken: 10  $\mu$ m.

Um zeigen zu können, welchen Effekt Hydrophobizität und Zugabe von Hydroxy-Fettsäuren auf die weitere pathogene Entwicklung der *rop1* Mutante haben, wurde der Stamm SG200 $\Delta$ rop1-AM1 hergestellt. Mit SG200AM1 als Kontrolle wurde SG200 $\Delta$ rop1-AM1 auf Appressorienbildung auf Parafilm mit und ohne Zugabe von 100  $\mu$ M 16-Hydroxypalmitinsäure getestet. Hierbei zeigte sich, dass bereits die Inkubation auf dem hydrophoben Parafilm bei beiden Stämmen ausreichte, um mit geringer Effizienz die Bildung von Appressorien zu induzieren (Abb. 34 A-D).

Die Quantifikation der Appressorien zeigte, dass in beiden Stämmen die Rate der Appressorien-bildenden Filamente bei etwa 14 % liegt und bei Zugabe von 16-Hydroxypalmitinsäure auf 39 % bei SG200AM1 bzw. 24 % bei SG200 $\Delta$ rop1AM1 anstieg (Abb. 34. E). Dies zeigt, dass die Zunahme der Appressorienbildung durch den zusätzlichen Fettsäurestimulus in SG200AM1 statistisch signifikant ist ( $p=0,0016$ ), wogegen die Zunahme in SG200 $\Delta$ rop1AM1 statistisch nicht signifikant ist ( $p=0,22$ ).



**Abbildung 34: Filament- und Appressorienbildung können in SG200Δrop1AM1 durch einen hydrophoben Stimulus wieder hergestellt werden.**

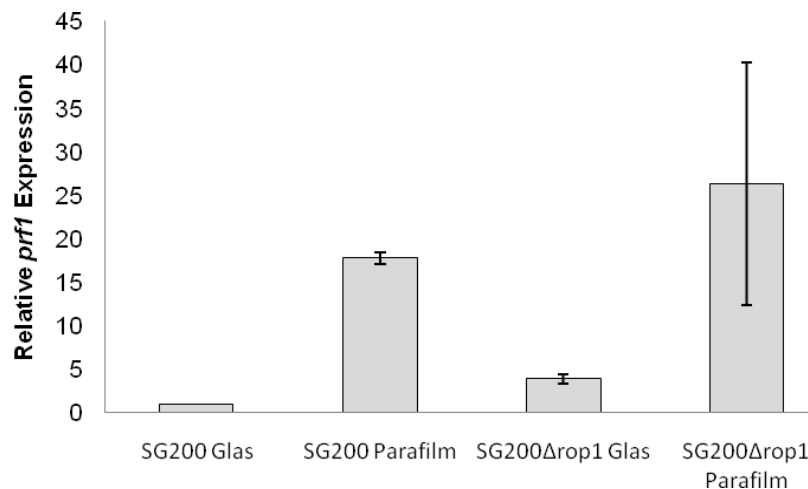
SG200AM1 und SG200Δrop1AM1 wurden wie in der Legende zu Abb. 12 beschrieben auf Parafilm aufgebracht und nach 20 h wurde die Appressorienbildungsrate mit Hilfe des AM1-Markers bestimmt. Bildung von septierten Filamenten und Appressorien, sowie Expression des AM1-Markers konnten in SG200 AM1 (**A und B**) und SG200Δrop1AM1 (**C und D**) auf Parafilm ohne Zugabe von Fettsäuren beobachtet werden. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm. Die Quantifikation der Appressorienbildung mit und ohne Zugabe von 16-Hydroxypalmitinsäure (**E**) erfolgte ebenfalls mikroskopisch. Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten, bei denen jeweils 200 Filamente untersucht wurden, sind gezeigt. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

Die Raten der Appressorienbildung waren in dieser Serie von Experimenten höher als in der ersten Quantifikation (Abb. 12), jedoch blieben die Unterschiede zwischen SG200AM1 mit bzw. ohne Zugabe von 16-Hydroxypalmitinsäure im Verhältnis gleich. Im Folgenden wurde mittels Real-Time PCR überprüft, ob die Inkubation der Zellen auf der hydrophoben Oberfläche auch in SG200Δrop1AM1 die Expression von *prf1*

induziert, oder ob die beobachtete Komplementation des  $\Delta rop1$  Phänotyps unabhängig von Prf1 ist.

Dazu wurden SG200 und SG200 $\Delta rop1$ AM1 auf Glas bzw. Parafilm aufgesprüht. Die so behandelten Zellen wurden, nach 8 Stunden Inkubation geerntet und für eine Gesamt-RNA Präparation verwendet (siehe Material und Methoden).

Mittels Real-Time PCR wurde nachgewiesen, dass die Expression von *prf1* in den SG200 Zellen die auf Parafilm inkubiert wurden, verglichen mit den auf Glas inkubierten, 18-fach anstieg (Abb. 35, vgl. auch Abb. 30). Die Proben für dieses Experiment und die im vorhergehenden Kapitel beschriebene Real-Time PCR wurden parallel genommen, somit liegen hier für SG200 die gleichen Werte vor. In SG200 $\Delta rop1$ AM1 zeigte sich im Vergleich zu SG200AM1 eine etwa 3-fach erhöhte *prf1* Expression auf Glas. Auf Parafilm im Vergleich zu Glas konnte eine von 3-fach auf nahezu 25-fach erhöhte *prf1* Expression festgestellt werden (Abb. 35). Die *prf1*-Expression beider Stämme auf Parafilm unterschied sich nicht signifikant ( $p=0,58$ ).



**Abbildung 35: Die *prf1* Expression in SG200 $\Delta rop1$ AM1 kann durch einen hydrophoben Stimulus wieder hergestellt werden.** SG200 und SG200 $\Delta rop1$ AM1 wurden bei  $OD_{600}$ : 1 in 2% YEPSL resuspendiert und auf Glas bzw. Parafilm gesprüht. Nach 8 h Inkubation wurde die Gesamt-RNA isoliert. Aus diesen Proben hergestellte cDNA diente als Ausgangsmaterial für die quantitative Real-Time PCR. Eine Induktion von *prf1* konnte auf Parafilm beobachtet werden. Das konstitutiv exprimierte *ppi*-Gen diente in allen Real-Time Analysen als Kontrolle. Das Experiment wurde in Triplikat durchgeführt. Der Standardfehler ist gezeigt. Der Expressionswert von SG200 auf Glas diente als Referenz und wurde auf 1 gesetzt.



## 2.12 Differentielle Genexpression in SG200AM1 als Antwort auf Hydrophobizität und Hydroxy-Fettsäurestimulus

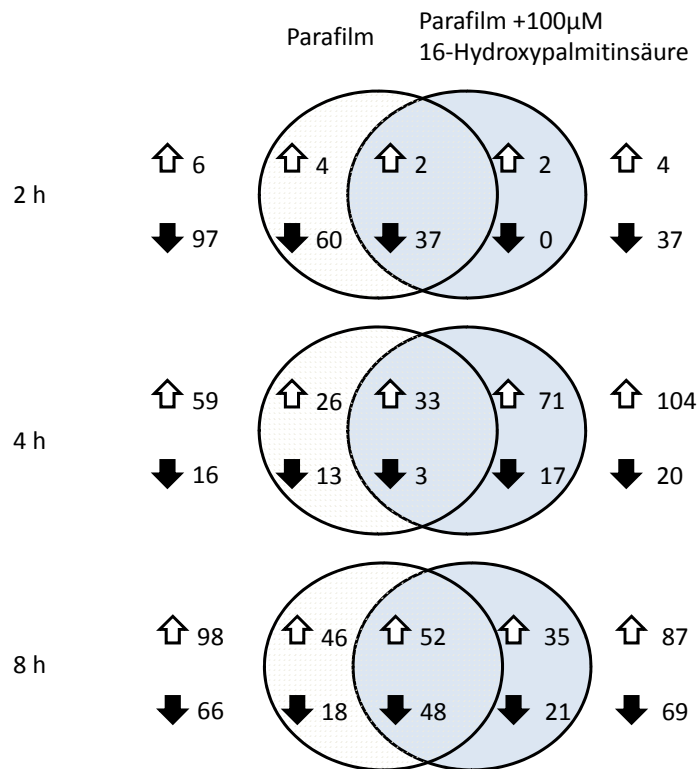
Zur Identifizierung von Genen, die in der frühen Phase der pathogenen Differenzierung transkriptionell reguliert werden, wurde das Gesamt-Expressionsprofil von SG200AM1 analysiert. Dieser Stamm wurde gewählt, da er ohne mit einem kompatiblen Kreuzungspartner zu fusionieren, durch Expression eines kompatiblen bE1/bW2 Heterodimers sofort in filamentöser Form wachsen kann (siehe Einleitung). Dadurch wurde, im Vergleich zu Kreuzungen, eine synchronere Entwicklung der Zellen und somit auch eine synchronere Erfassung der Änderungen der Genexpression gewährleistet. Außerdem erlaubte dies den mikroskopischen Nachweis, dass die Appressorienbildung in dem jeweiligen Versuchsansatz stattgefunden hat.

Für die Analyse der Genexpression wurden 1 ml Pilzellsuspension ( $OD_{600}$ : 1) in 2% YEPSL mit 1% Ethanol oder 100  $\mu$ M 16-Hydroxypalmitinsäure aufgenommen. Die Zellen wurden mit Ethanol auf eine hydrophile Glasoberfläche bzw. auf Parafilm gesprüht. Ebenso wurde eine weitere Probe mit 16-Hydroxypalmitinsäure ebenfalls auf Parafilm aufgesprüht (siehe Material und Methoden). Die Zellen wurden dann für zwei, vier und acht Stunden bei 28°C und 100% Luftfeuchte unter den jeweiligen Bedingungen inkubiert. Diese Zeitpunkte wurden gewählt, um bereits frühe transkriptionelle Antworten von *U. maydis* auf die beiden Stimuli beobachten zu können. Mikroskopische Analysen zeigten, dass die Zellen nach zwei Stunden unter allen Bedingungen undifferenziert waren. Nach vier Stunden adherierten die Zellen auf dem Parafilm und nach acht Stunden begann die Filamentbildung auf Parafilm (nicht gezeigt). Auf Glas blieben die Zellen undifferenziert.

Für die Transkriptomanalyse wurden die Pilzzellen nach den verschiedenen Inkubationszeiten von den Oberflächen geerntet und anschließend die Gesamt-RNA extrahiert (siehe Material und Methoden). Es wurden drei unabhängige biologische Replikate pro Bedingung und Zeitpunkt angefertigt. Nach Hybridisierung der Arrays wurden alle Gene, die eine Änderung ihres Expressionswertes von mindestens 2, eines absoluten Expressionswertes  $>40$  und eines p-Wertes von  $>0,005$  aufwiesen als signifikant reguliert betrachtet (siehe Material und Methoden). Die *U. maydis* DNA-Mikroarray-Chips wurden von der Firma Affymetrix, basierend auf der BayerCropScience Genomsequenz hergestellt. Jeder putative ORF ist durch einen Probeset repräsentiert. Probesets, die keine Übereinstimmung mit der MUMDB-

Annotation aufweisen, wurden in dieser Studie nicht berücksichtigt. Daher unterscheidet sich die Anzahl der differentiell regulierten Probesets von der Anzahl der differentiell regulierten Gene (MUMDB: Stand 01.2009).

Im Vergleich zu Glas waren nach den o.g. Kriterien in SG200AM1 auf Parafilm nach zwei Stunden 6 Gene hoch und 97 Gene herunterreguliert. Verglichen damit reagierten die Zellen, die auf Parafilm in Anwesenheit von 100  $\mu$ M 16-Hydroxypalmitinsäure inkubiert wurden sehr ähnlich, denn bis auf zwei von vier hochregulierte Gene fanden sich 39 der 41 regulierten Gene auch in der Parafilm Probe (Abb. 36). Nach vier Stunden konnten auf Parafilm 59 Gene transkriptionell als induziert und 16 als reprimiert werden. Wenn beide Stimuli gegeben wurden, wurden 104 Gene hoch- und 20 herunterreguliert. Von den induzierten Genen konnten 33 unter beiden Bedingungen gefunden werden, von den reprimierten 3 (Abb. 36).



**Abbildung 36: Vergleichende Transkriptomanalyse von SG200AM1 nach 2, 4 und 8 Stunden Inkubation.**

In den Schnittmengendiagrammen ist die Gesamtzahl aller differentiell regulierten Gene von Zellen, die auf Parafilm oder auf Parafilm in Gegenwart von 100  $\mu$ M 16-Hydroxypalmitinsäure inkubiert wurden, angegeben.

In den Proben, die nach acht Stunden Inkubationszeit genommen wurden, war eine höhere Überlappung in der Genexpression der Zellen auf Parafilm mit denen die auf Parafilm in Anwesenheit von 16-Hydroxypalmitinsäure inkubiert wurden festzustellen, als zu vorherigen Zeitpunkten. Von 164 auf Parafilm, bzw. 156 auf Parafilm mit 16-

Hydroxypalmitinsäure transkriptionell regulierten Genen konnten 100 unter beiden Bedingungen gefunden werden (Abb. 36.). Die vollständigen Listen aller unter den o.g. Bedingungen differentiell regulierten Gene sind im Anhang (Tabellen 9-14) aufgeführt.

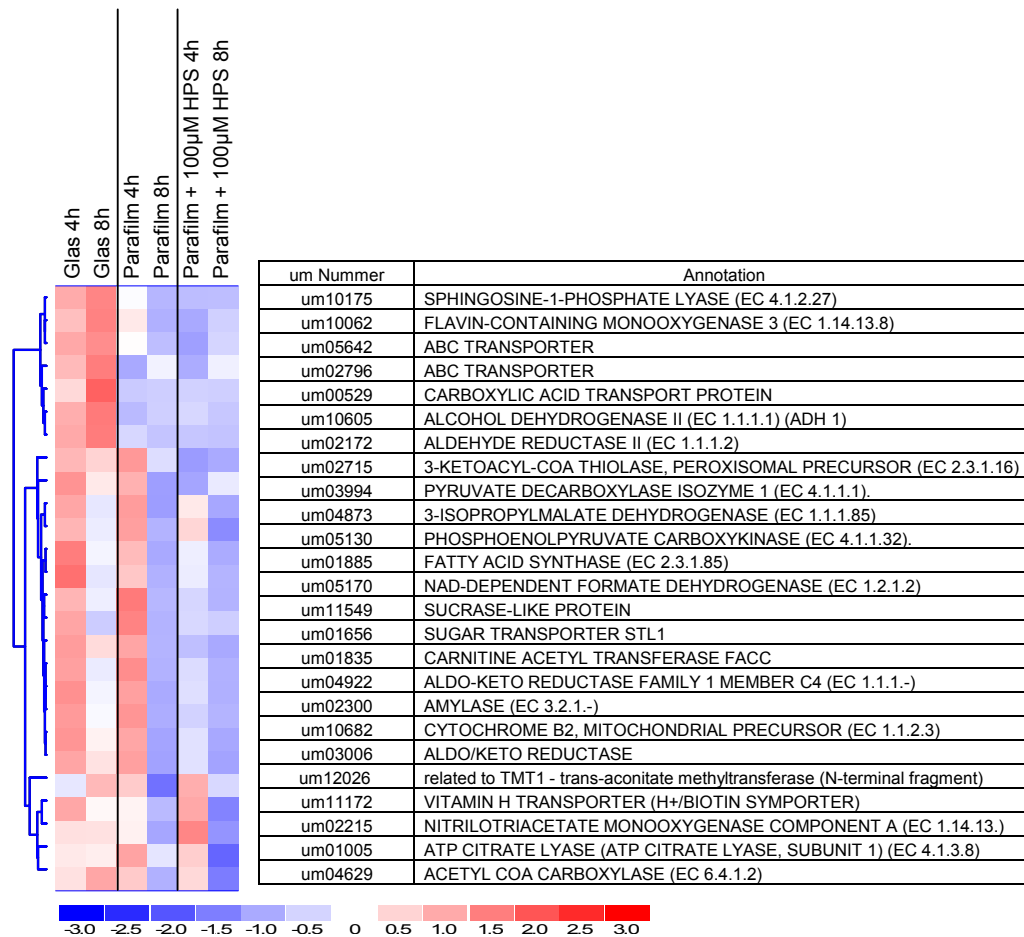
Unter den Genen, die auf Parafilm induziert waren, wurde nach 4 und 8 Stunden *dik6* gefunden, das zuvor als b-reguliert beschrieben worden war (M. Vranes und J. Kämper, persönliche Mitteilung). Es fand sich in allen Proben unter den am stärksten hochregulierten Genen um11057, ein Peptid-Transporter Mtd1-Homolog, ein Gen, das auch in den Dikaryen von *Schizophyllum commune* stark induziert ist und in der Bildung von Luftmycel eine Rolle spielt [LENGELER UND KOTHE, 1999]. Weitere differentiell regulierte Gene konnten mittels dieser Transkriptom-Analysen ebenfalls gefunden werden. Hervorzuheben sind hierbei die reprimierten Gene des primären Kohlenstoff-Metabolismus und der hohe Anteil putativ sekretierter Proteine bei den hochregulierten Genen. Diese werden in den folgenden beiden Kapiteln näher besprochen.

## **2.13 Die Expression von Genen des primären Kohlenstoff-Metabolismus wird durch Hydrophobizität und Fettsäure-Stimulus reprimiert**

Zur weiteren Analyse wurden die differentiell regulierten Gen-Sets aus allen Proben mittels FunCatDB in funktionelle Kategorien eingeteilt, um die Gene so auf Anreicherungen in bestimmten funktionellen Kategorien hin zu untersuchen (<http://mips.gsf.de/projects/funcat>). In den hochregulierten Genen konnte keine signifikante Anreicherung von Genen bestimmter funktioneller Kategorien beobachtet werden. Bei den herunterregulierten Genen zeigte sich jedoch nach vier und acht Stunden eine hochsignifikante Anreicherung in der Kategorie 01.05 (C-compound and carbohydrate metabolism) (siehe Anhang Tabelle 9-14). Die dort identifizierten Gene wurden zu einer Liste zusammengestellt. Basierend auf diesen Daten der Transkriptomanalyse wurde eine hierarchische Cluster-Analyse (Abb. 37) mittels des Programms dChip [LI UND HUNG WONG, 2001; LI UND WONG, 2003] durchgeführt.

Bei dieser Art der Expressionsanalyse werden die Gene mit dem ähnlichsten Expressionsmuster zunächst schrittweise zu Clustern zusammengefasst, und diese

wiederum zu größeren Clustern zusammengefügt. Das Clustern erfolgt dabei nach den in Golub *et al.* (1999) und Eisen *et al.* (1998) beschriebenen Methoden.



**Abbildung 37: Hierarchische Cluster-Analyse der Gene des primären Kohlenstoff-Metabolismus.** Gezeigt ist die hierarchische Cluster-Analyse der nach 4 bzw. 8 h herunterregulierten Gene des primären Kohlenstoff-Metabolismus. Die Gene wurden manuell zu einer Liste zusammengefasst und anschließend für eine hierarchische Clusterung verwendet [GOLUB *et al.*, 1999; EISEN *et al.*, 1998]. Die relative Expressionsstärke ist durch den Farbcode im Bild gezeigt.

## 2.14 Die Expression von putativ sekretierten Proteinen wird durch Hydrophobizität und Fettsäurestimulus erhöht

Bioinformatische Analysen ergaben, dass das Sekretom von *U. maydis* 380 sekretierte Proteine ohne bekannte Funktion und 168 sekretierte Proteine mit enzymatischer Funktion beinhaltet. Insgesamt besitzt *U. maydis* damit 548 putative sekretierte Proteine [MÜLLER *et al.*, 2008a]. Die in dieser Arbeit generierten Transkriptom-Daten wurden im Hinblick auf die transkriptionelle Regulation dieser Proteine untersucht. Dabei zeigte sich eine signifikante Erhöhung ( $p < 0,001$ ) des Anteils putativ sekretierter Proteine (Tab. 1.) in der Gruppe der auf Parafilm induzierten Gene (Parafilm UP) und in der auf Parafilm in Anwesenheit von 16-Hydroxypalmitinsäure induzierten Gene (ParaHPS UP). Diese Erhöhung konnte erstmals nach einer Inkubationsdauer in Anwesenheit der Stimuli nach vier Stunden beobachtet werden, wo 32,2 % (Parafilm UP) bzw. 19,2 % (ParaHPS UP) der induzierten Gene für putativ sekretierte Proteine kodieren. Nach acht Stunden Inkubationszeit lagen die Anteile putativ sekretierter Proteine in beiden Fällen bei etwa 25 %.

**Tabelle 1: Anteil putativ sekretierter Proteine an den induzierten Genen**

	Regulierte Gene	Sekretiert	[%]	p-Wert
2h Glas vs. Parafilm	6	0	0	0,399716
2h Glas vs. ParaHPS	4	1	25	0,288359
4h Glas vs. Parafilm	59	19	32,2	9,57E-08
4h Glas vs. ParaHPS	104	20	19,23	0,000227
8h Glas vs. Parafilm	87	23	26,43	2,57E-07
8h Glas vs. ParaHPS	86	21	24,41	3,48E-06

Die auf Parafilm mit und ohne 16-Hydroxypalmitinsäure induzierten Gene sind in den Tabellen 2 (4 Stunden) und 3 (8 Stunden) zusammengefasst. Dabei sind Gene, die für Proteine mit einer Funktion in Polymermodifikation und –abbau blau hinterlegt, solche die an der Modifikation der pilzlichen Zellwand beteiligt sind orange, Zellwandproteine gelb, Proteine mit anderweitiger enzymatischer Funktion grün und Proteine mit unbekannter Funktion grau hinterlegt.

Tabelle 2: Für putativ sekretierte Proteine codierende hochregulierte Gene nach 4h.

**SG200 Glas vs. Parafilm**

<b>um Nummer</b>	<b>Annotation</b>
um03024	subtilisin-like protease
um10881	Ribonuclease T1
um06118	tripeptidyl peptidase
um03924	repellent protein 1 precursor
um00891	related to cell wall protein UTR2
um00330	related to UTR2 - cell wall protein
um05995	related to Acid phosphatase precursor
um02727	1,4-beta-N-acetylmuramidase
um04247	Esterase/lipase/thioesterase
um10068	Metallo-phosphoesterase
um04533	FAD linked oxidase, N-terminal
um05104	putative protein
um04027	hypothetical protein
um05704	conserved hypothetical protein
um03065	putative protein
um05046	conserved hypothetical protein
um01786	putative protein
um01976	putative protein

**SG200 Glas vs. Parafilm + 100µM 16-Hydroxypalmitinsäure**

<b>um Nummer</b>	<b>Annotation</b>
um03024	subtilisin-like protease
um10881	Ribonuclease T1
um00411	metalloprotease
um03947	carboxypeptidase
um04364	exo-1,3-beta-glucanase
um00876	exo-1,3-beta-glucanase
um00891	related to cell wall protein UTR2
um00330	related to UTR2 - cell wall protein
um01957	alpha-mannosidase
um04247	Esterase/lipase/thioesterase
um04533	FAD linked oxidase, N-terminal
um05104	putative protein
um03065	putative protein
um04027	hypothetical protein
um03586	putative protein
um05819	hypothetical protein
um05046	conserved hypothetical protein
um01976	putative protein
um01786	putative protein

**Tabelle 3: Für putativ sekretierte Proteine codierende hochregulierte Gene nach 8h.  
SG200 Glas vs. Parafilm**

<b>um Nummer</b>	<b>Annotation</b>
um10881	Ribonuclease T1
um01422	lipase
um06190	chitinase
um01788	chitin deacetylase
um02758	chitinase
um00330	related to UTR2 - cell wall protein
um02157	glucose oxidase
um03615	glucose oxidase
um04247	Esterase/lipase/thioesterase
um05704	conserved hypothetical protein
um03065	putative protein
um05046	conserved hypothetical protein
um04027	hypothetical protein
um05227	hypothetical protein
um05631	conserved hypothetical protein
um05528	conserved hypothetical protein
um12127	hypothetical protein
um03776	putative protein
um01976	putative protein

**SG200 Glas vs. Parafilm + 100µM 16-Hydroxypalmitinsäure**

<b>um Nummer</b>	<b>Annotation</b>
um10881	Ribonuclease T1
um01422	lipase
um06118	tripeptidyl peptidase
um06190	chitinase
um01788	chitin deacetylase
um03924	repellent protein 1 precursor
um02157	glucose oxidase
um00913	glyoxal oxidase
um04247	Esterase/lipase/thioesterase
um02727	1,4-beta-N-acetylmuramidase
um03615	glucose oxidase
um01855	conserved hypothetical protein
um03065	putative protein
um05704	conserved hypothetical protein
um01779	hypothetical protein
um11886	conserved hypothetical protein
um05528	conserved hypothetical protein
um05104	putative protein
um05046	conserved hypothetical protein
um01204	related to PRY1 proteins
um04027	hypothetical protein
um05227	hypothetical protein
um01297	conserved hypothetical Ustilago-specific protein

### 3 Diskussion

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *U. maydis* nach Kontakt mit der Pflanzenoberfläche sowohl Hydroxy-Fettsäuren, wie auch Hydrophobizität der Oberfläche wahrnimmt. Beide Signale induzieren distinkte morphologische Differenzierungsschritte. Bei Vorliegen beider Signale erfolgt eine effiziente Differenzierung von Appressorien *in vitro*. Voraussetzung hierfür war, dass die verwendeten Stämme ein aktives bE/bW Heterodimer exprimierten und über die Fähigkeit zur autokrinen Pheromonstimulation verfügten [MENDOZA-MENDOZA *et al.*, 2009a].

Die Effekte von Fettsäuren auf die Entwicklung von Infektionsstrukturen wurden bereits in einigen pflanzenpathogenen Pilzen gezeigt. In *C. gloeosporioides* lösen beispielsweise Oberflächenwachse der Wirtspflanze Avocado die Bildung von Appressorien aus [KOLATUKUDY *et al.*, 1995]. In *M. grisea* induzieren ebenfalls Wachs-Komponenten, sowie die Fettsäure 1,16-Hexadecanediol, die Bildung von Appressorien [UCHIYAMA UND OKUYAMA, 1990, GILBERT *et al.*, 1996]. In *A. nidulans* konnten die „Psi Faktoren“, die von der Linolensäure (C<sub>18</sub>) abgeleitet sind, als hormonelle Aktivatoren der sexuellen Sporulation identifiziert werden [CHAMPE UND EL-ZAYAT, 1989]. In *C. albicans* und *Cryptococcus neoformans* wurde gezeigt, dass ihre Keimung durch Fettsäuren wie Prostaglandin E2 und Thromboxan B2 ihres Säugetier-Wirts verstärkt werden kann [NOVERR UND HUFFNAGLE, 2004]. Der Mechanismus der Perzeption ist jedoch keinem der aufgeführten Beispiele aufgeklärt. Für *U. maydis* konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Hydroxy-Fettsäuren Filamentbildung induzieren und dass dieser Effekt auf einer Induktion der Pheromone beruht.

#### 3.1 Hydroxy-Fettsäuren induzieren pheromonabhängige Filamentbildung in *U. maydis*.

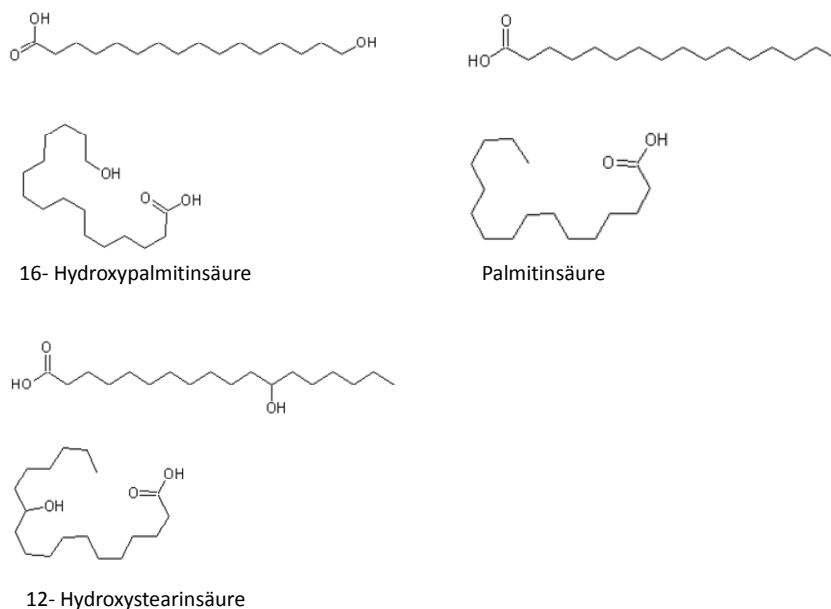
In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt der Cutinmonomere 16-Hydroxypalmitinsäure und 12-Hydroxystearinsäure auf *U. maydis* untersucht. In dem solopathogenen, haploiden Stamm SG200 [KÄMPER *et al.*, 2006] konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit dieser Hydroxy-Fettsäuren zu einer konzentrationsabhängigen Bildung von mit Zytoplasma gefüllten, unseptierten



Filamenten, jedoch nicht zu Appressorienbildung führt. Diese Filamente waren morphologisch von Konjugationshyphen nicht zu unterscheiden. Da SG200 jedoch ein aktives bE/bW Heterodimer exprimiert und dadurch viele Gene im Vergleich zu haploiden Zellen differentiell reguliert werden [BRACHMANN *et al.*, 2001; KAHMANN UND KÄMPER, 2004], kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich diese Strukturen von Konjugationshyphen unterscheiden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass durch Hydroxy-Fettsäuren die Pheromon-Genexpression aktiviert wird. In dikaryotischen Filamenten, sowie in diploiden, für *a* und *b* heterozygoten Stämmen, ist die Pheromon Signaltransduktion normalerweise durch Anwesenheit des aktiven bE/bW Heterodimers reprimiert [LAITY *et al.*, 1995; URBAN *et al.*, 1996]. Die Zugabe von Hydroxy-Fettsäuren hebt diese Repression offensichtlich auf. CI13 ist der Vorläuferstamm von SG200, dem jedoch die Möglichkeit zur autokrinen Pheromon-Stimulation fehlt, da er das für das kompatible Pheromon kodierende *mfa2* Gen nicht enthält [BÖLKER *et al.*, 1995b]. CI13 war nicht in der Lage, auf die Fettsäurestimulation zu reagieren. Dies zeigt, dass die Pheromon-abhängige Signaltransduktion durch kompatibles Pheromon aktiviert werden muss, um die beobachtete Filamentbildung zu induzieren. Hydroxy-Fettsäuren können also das Pheromon nicht ersetzen.

Filamentbildung von *U. maydis* als morphologische Antwort auf die Inkubation in Anwesenheit von Lipiden (Tween40) bzw. Palmitinsäure wurde bereits zuvor beschrieben [KLOSE *et al.*, 2004]. Jedoch wurden in diesen Experimenten deutlich längere Inkubationszeiten von 5 Tagen verwendet, und die unter diesen Bedingungen induzierten Filamente wurden als septiert und mit Zytoplasma gefüllt beschrieben. Somit folgerten die Autoren, dass es sich bei diesen Filamenten um solche handelt, die üblicherweise in der Pflanze während der biotrophen Interaktion gebildet werden. Unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen konnten nach Kurzzeitinkubation weder Tween40 noch Palmitinsäure Filamentbildung induzieren. Im Gegensatz dazu induzierten 16-Hydroxypalmitinsäure bzw. 12-Hydroxystearinsäure die effiziente Bildung von Zytoplasma gefüllten Filamenten in SG200 bereits nach 16 Stunden. 16-Hydroxypalmitinsäure und Palmitinsäure unterscheiden sich nur durch eine endständige Hydroxyl-Gruppe, die der Palmitinsäure fehlt (Abb. 38). Eine mögliche Erklärung für den Unterschied bezüglich der Induktion von Filamentbildung liefern die logP-Werte der verschiedenen Fettsäuren [<http://www.vcclab.org>; TETKO *et al.*, 2005]. LogP Werte zeigen, wie lipophil ein Molekül ist. Palmitinsäure besitzt einen logP von 7,23, 16-Hydroxypalmitinsäure einen logP von 5,93 und die ebenfalls biologisch aktive 12-Hydroxystearinsäure einen logP von 5,98. Die beiden biologisch aktiven

Hydroxy-Fettsäuren weisen einen ähnlichen logP-Wert auf, dieser liegt signifikant niedriger als der logP-Wert der biologisch inaktiven Palmitinsäure. Möglicherweise könnte eine Internalisierung von Palmitinsäure durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der pilzlichen Zellwand verhindert werden und nur 16-Hydroxypalmitinsäure und 12-Hydroxystearinsäure könnten bis zu einem putativen Rezeptor vordringen. Allerdings sollte die Membranpermeabilität der lipophileren Palmitinsäure höher sein, als die von 12-Hydroxystearinsäure und 16-Hydroxypalmitinsäure [ORBACH UND FINKELSTEIN, 1980; POHL *et al.*, 2008]. Dies könnte auf die Existenz eines spezifischen Transporters oder Rezeptors für die induzierenden Hydroxy-Fettsäuren hindeuten.



**Abbildung 38: Chemische Strukturen der in dieser Arbeit verwendeten Fettsäuren.**

Die Cuticula von *Z. mays* besteht aus mindestens 29 verschiedenen Fettsäuren, die mittels Massenspektrometrie identifiziert werden konnten (U. Linne und M. Marahiel, pers. Mitteilung). Es konnte gezeigt werden, dass diese Mischung verschiedener Monomere den gleichen Effekt hat, wie die in dieser Arbeit verwendeten Hydroxy-Fettsäuren [MENDOZA-MENDOZA *et al.*, 2009a]. Die Frage, ob neben den hier beschriebenen induzierenden Hydroxy-Fettsäuren in der Mischung weitere enthalten sind, die biologisch aktiv sind, kann derzeit nicht beantwortet werden. Gleiches gilt für die Frage, welche dieser Monomere auf der Blattoberfläche überhaupt durch pilzliche Esteraseaktivität freigesetzt werden, um anschließend die Differenzierung

von *U. maydis* zu induzieren. *U. maydis* besitzt 16 Esterasen, darunter vier putative Cutinasen, um00445, um03563, um11211 und um02506 [MÜLLER *et al.*, 2008]. Mittels RT-PCR wurde gezeigt, dass drei der entsprechenden Gene transkriptionell nach 16 Stunden Wachstum auf der Pflanzenoberfläche induziert sind (A. Djamei, persönl. Mitteilung). Die Deletion einzelner putativer Cutinasegene und auch eine Dreifach-Deletionsmutante der transkriptionell induzierten Cutinasen zeigten keinen erkennbaren Phänotyp hinsichtlich der Appressorienbildung (A. Mendoza-Mendoza, pers. Mitteilung und eigene Experimente, nicht gezeigt).

### **3.2 Die Perzeption von induzierenden Hydroxy-Fettsäuren könnte über G-Protein gekoppelte Rezeptoren erfolgen**

Fettsäurerezeptoren wurden bislang lediglich in Säugerzellen identifiziert [XUE *et al.*, 2008]. Diese Rezeptoren weisen 7-Transmembran Domänen auf und leiten ihre Signale durch G-Proteine weiter [CIVELLI, 2005]. Die in Fettsäureperzeption implizierten Rezeptoren GPR40, 41, 42, 43, 120 besitzen unterschiedliche Spezifitäten bezüglich der Kettenlänge der von ihnen wahrgenommenen Fettsäuren und werden gewebespezifisch exprimiert [HIRASAWA *et al.*, 2008]. Sequenzvergleiche dieser Rezeptoren mit dem Genom von *U. maydis* zeigte jedoch keinerlei Konservierung auf Aminosäureebene. Am wahrscheinlichsten wäre die Fettsäureperzeption über funktionelle Homologe von GPR40 oder GPR120, da diese beiden Rezeptoren durch C<sub>15</sub>- C<sub>16</sub> bzw. C<sub>16</sub>- C<sub>22</sub> Fettsäuren aktiviert werden. Der Effekt auf die Signaltransduktion ist bisher nur für GPR40 bekannt. Hierbei werden nach Fettsäureperzeption cAMP-Signaltransduktion und PKA aktiviert [FENG *et al.*, 2006].

Der am besten beschriebene G-Protein gekoppelte Rezeptor in *U. maydis* ist der Pheromon Rezeptor Pra [BÖLKER *et al.*, 1992]. Nach Perzeption von kompatiblen Pheromon über diesen Rezeptor erfolgt die cAMP abhängige Signaltransduktion über die Aktivierung von Gpa3 [KRÜGER *et al.*, 1998]. In *U. maydis* konnten 4 Gα-Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine identifiziert werden, jedoch konnte nur bei Deletion von *gpa3* ein Phänotyp festgestellt werden [REGENFELDER *et al.*, 1997]. Wie die Experimente mit dem hier beschriebenen *in vitro* System zeigten, trägt der Fettsäurestimulus zwar wesentlich zur Effizienz der Appressorienbildung bei, ist jedoch nicht essentiell für diesen Differenzierungsschritt. Somit wäre es möglich,

dass eine der übrigen G $\alpha$ -Untereinheiten eine Rolle in der Integration des Fettsäurestimulus spielt. Daher wäre es interessant, die Reaktion von SG200 G $\alpha$ -Mutanten auf den Fettsäurestimulus zu testen.

### **3.3 Der Kontakt zu hydrophoben Oberflächen induziert pathogene Differenzierung in *U. maydis***

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in Stämmen, die ein aktives bE/bW Heterodimer exprimieren, die Bildung von septierten Filamenten, in denen nur die Spitzenzelle mit Zytoplasma gefüllt ist, durch Kontakt mit einer hydrophoben Oberfläche induziert werden kann. Diese Differenzierung war unabhängig von einem Fettsäurestimulus. Diese Filamente waren morphologisch vergleichbar mit den auf der Pflanzenoberfläche gebildeten, dikaryotischen Filamenten [SNETSELAAR UND MIMS, 1993]. Während Glas mit einem Kontaktwinkel von 15° nicht induzierend wirkte, konnten alle getesteten Oberflächen mit einem Kontaktwinkel >53° die Filamentbildung induzieren. Die Effizienz, mit der die Filamentbildung erfolgte, war mit etwa 35%- 40% auf allen induktiven Oberflächen vergleichbar. SG200 zeigte neben Filamentbildung auf den hydrophoben Oberflächen in etwa 5% der Filamente die Ausbildung von Appressorien.

### **3.4 Die Wahrnehmung der induktiven Oberfläche könnte durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Pilz und Oberfläche vermittelt werden**

Der Mechanismus, mit dem *U. maydis* die hydrophobe Oberfläche wahrnimmt ist bislang nicht bekannt. *U. maydis* verfügt über so genannte Repellent Proteine, die in der Zellwand von dikaryotischen Filamenten eingelagert werden [TEERSTRA *et al.*, 2006]. Diese Proteine erlauben die Anheftung an hydrophobe Oberflächen [TEERSTRA *et al.*, 2006]. Damit übernehmen die Repellent Proteine die Rolle von Hydrophobinen, die z.B. in *M. grisea* und *S. commune* eine wichtige Rolle bei Adhäsion an hydrophobe Oberflächen spielen [KERSHAW UND TALBOT, 1998]. Repellent-Proteine und Hydrophobine sind jedoch vermutlich nicht an der Signalweiterleitung beteiligt, da die Moleküle außen auf der Zellwand aufgelagert

werden und somit nicht mit Rezeptoren oder Signalkomponenten im Zytoplasma interagieren können [DEZWAAN *et al.*, 1999; TEERSTRA *et al.*, 2009].

Die Perzeption einer hydrophoben Oberfläche könnte über Membranrezeptoren geschehen, die die Anheftung an die Oberfläche und eine damit verbundenen Konformationsänderung der Zellwand zwischen Pilz und Oberfläche wahrnehmen [KERSHAW UND TALBOT, 1998]. Für *M. grisea* wurde postuliert, dass Pth11 ein G-Protein gekoppelter Sensor für diese Art der Membranverformung ist, die durch die Anheftung an die hydrophobe Oberfläche hervorgerufen wird [DEZWAAN *et al.*, 1999]. Nach Perzeption leitet Pth11 den Stimulus in den cAMP Signalweg weiter [DEZWAAN *et al.*, 1999]. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Pth11 für die Wahrnehmung von Cutinmonomeren nötig ist [DEZWAAN *et al.*, 1999]. Pth11 ist das derzeit einzige beschriebene Beispiel für einen pilzlichen Membransensor. *U. maydis* besitzt kein Ortholog von Pth11. In *U. appendiculatus* werden Membranverformungen vermutlich über mechano-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle perzipiert [HOCH *et al.*, 1987]. Die beteiligten Kanalkomponenten wurden jedoch bislang nicht identifiziert. Auch in *U. maydis* spielt  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte Signaltransduktion eine Rolle in der Zellmorphogenese [ADAMÍKOVÁ *et al.*, 2004], die Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenströmen in der in der Oberflächenperzeption wurde bislang jedoch noch nicht untersucht. In *U. maydis* existiert ein putativer Calcium-Kanal (um05458). Es wäre interessant zu untersuchen, ob dieser Kanal, oder  $\text{Ca}^{2+}$  Ströme eine Rolle bei der Oberflächenperzeption spielen.

In *M. grisea* ist ein weiteres Protein, das putativ extrazelluläre Chitin-Bindende Protein CBP1, ebenfalls an der Oberflächenerkennung beteiligt. CBP1 Deletionsmutanten können auf künstlichen hydrophoben Oberflächen keine Appressorien mehr bilden, können dies aber auf der Pflanzenoberfläche oder nach Zugabe von Cuticula-Komponenten [KAMAKURA *et al.*, 2002]. In *U. maydis* existiert kein offensichtliches Ortholog dieses Proteins, jedoch weist um05439, ebenso wie CBP1, eine ungewöhnliche Chitin-Bindedomäne auf und besitzt keine Paraloge (M. Bölker und R. Kahmann, pers. Mitteilung). Zurzeit werden die membranständigen Proteine Sho1 und Msb2 im Hinblick auf ihre Rolle in der Wahrnehmung von Pflanzensignalen während der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* untersucht. Bisherige Daten zeigen, dass diese Proteine eine wichtige Rolle in der Appressorienbildung auf hydrophoben Oberfläche besitzen und die Virulenz entsprechender Deletionsmutanten beeinträchtigt ist (D. Lanver und A. Mendoza-Mendoza, pers. Mitteilung).

### 3.5 Die Anwesenheit von Hydroxy-Fettsäuren führt auf hydrophober Oberfläche zur effizienten Bildung von Appressorien

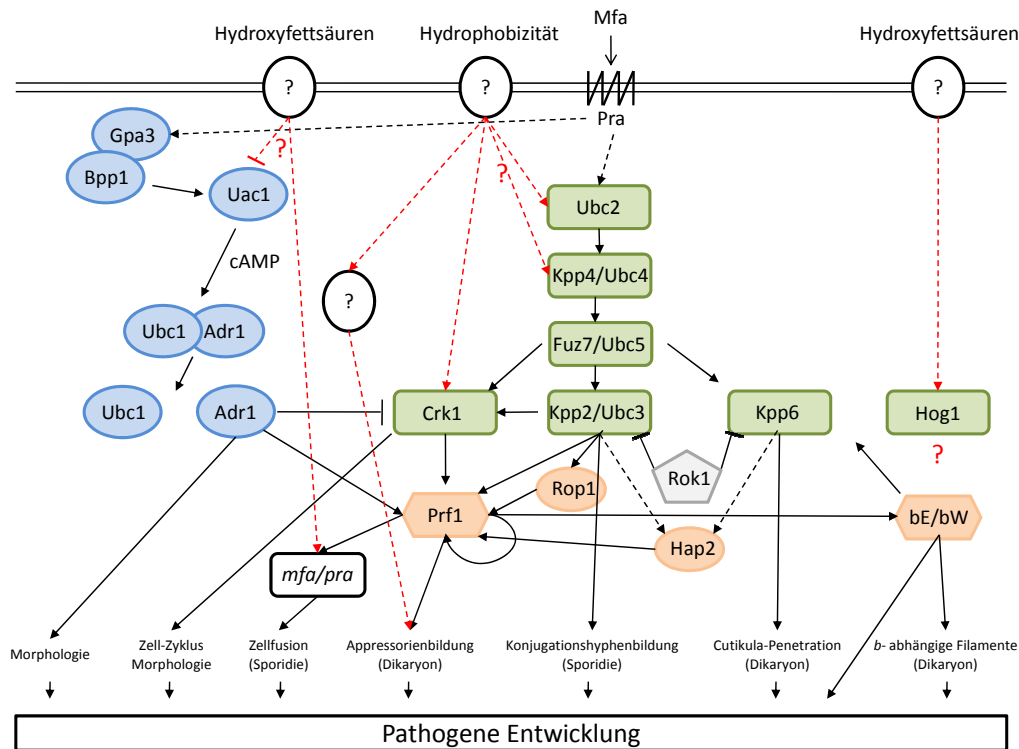
In einigen anderen pflanzenpathogenen Pilzen konnten bisher Stimuli, die zur Ausbildung von Infektionsstrukturen führen identifiziert werden [DEAN, 1997; DEISING *et al.*, 2000; KOLATTUKUDY *et al.*, 1995; STAPLES UND HOCH, 1997; TUCKER UND TALBOT, 2001]. Jedoch war in diesen Systemen jeweils ein einziger Stimulus hinreichend für die Induktion der Differenzierung. Interessanterweise konnten hier für *U. maydis* erstmals zwei unterschiedliche Stimuli beschrieben werden, die gemeinsam für die effiziente Induktion von Appressorien benötigt werden. Die Existenz zweier Stimuli könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Differenzierung von *U. maydis* auf der Pflanzenoberfläche in zwei Schritten geschieht. Nach der Zellfusion könnte die Filamentbildung initial durch die hydrophobe Oberfläche induziert werden. Während das Filament auf der Cuticula wächst, könnten Cutin-abbauende Enzyme, die entweder konstitutiv oder induziert durch den Oberflächenkontakt exprimiert und sekretiert werden, Cutinmonomere freisetzen, und dies würde dann zu einer erhöhten Filament- und Appressorienbildung führen.

In Anwesenheit von Hydroxy-Fettsäuren konnte die Entwicklung von Appressorien bei Inkubation in Flüssigmedium oder auf hydrophilem Glas nicht beobachtet werden. Auf hydrophoben Oberflächen hingegen konnte die Zugabe von Hydroxy-Fettsäuren die Ausbildung von Appressorien in bis zu 27% der Filamente induzieren. Zudem konnte in weiteren Experimenten eine Erhöhung des Anteils filamentös wachsender Zellen auf der hydrophoben Oberfläche beobachtet werden [MENDOZA-MENDOZA *et al.*, 2009a]. Adhäsion von filamentösen Zellen konnte sowohl auf hydrophilem Glas nach Zugabe von Hydroxy-Fettsäuren, als auch auf hydrophoben Oberflächen beobachtet werden. Damit ist es vermutlich die Wechselwirkung der hydrophoben Pilz-Zellwand in filamentösen Zellen [TEERSTRA *et al.*, 2009] mit der hydrophoben Oberfläche und nicht die bloße Adhäsion des Filaments an die Oberfläche, die die Appressorienbildung auslöst. Hydrophobizität scheint also das primäre Signal für die Appressorienbildung zu sein, während die Fettsäuren einen verstärkenden Effekt haben. Auf der Pflanzenoberfläche differenzieren etwa 20% der filamentös wachsenden Zellen ein Appressorium [DOEHLEMAN *et al.*, 2009], d.h. dieser Wert ist mit dem *in vitro* beobachteten vergleichbar. Da die Cuticula an ihrer Oberfläche Wachskristalle besitzt, wurde in dieser Arbeit auch experimentell auf eine mögliche Rolle dieser Wachse eingegangen. Auf hydrophoben Oberflächen hatte die Zugabe

einer Wachspräparation von *Z. mays* keinen induzierenden Effekt. Die unter den beschriebenen *in vitro* Bedingungen induzierten Appressorien sind morphologisch nicht von denen auf der Pflanze zu unterscheiden. Dies unterstreichen auch Messungen des mittleren Durchmessers. Das hier etablierte System induzierte nicht nur in dem solopathogenen Stamm SG200 Filament- und Appressorienbildung. Auch kompatible, haploide Stämme konnten fusionieren und Appressorien entwickeln. Dies spricht dafür, dass die beiden hier charakterisierten Stimuli die entscheidenden von *U. maydis* nach Kontakt mit der Pflanzenoberfläche wahrgenommenen Pflanzenstimuli sind.

### **3.6 Die Signalkomponenten für Weiterleitung der pflanzlichen Stimuli**

In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass die konservierte, Pheromon-aktivierbare MAPK-Kaskade von essentieller Bedeutung für die morphologische Antwort nach Fettsäurestimulation bzw. hydrophobem Stimulus ist (vgl. Abb. 18). Ebenso essentiell wie die konservierte MAPK-Kaskade ist auch die Anwesenheit des Transkriptionsfaktors Prf1 und seine transkriptionelle Induktion durch die MAPK Crk1 [GARRIDO *et al.*, 2004]. In diesem Teil der Diskussion soll zunächst auf die Rolle der MAPK-Kaskade und auf die des cAMP-Weges eingegangen werden, bevor das Zusammenspiel der beiden Wege in der Koordination der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* diskutiert wird (Abb. 39).



**Abbildung 39: Modell für die mögliche Wirkung der pflanzlichen Stimuli auf die Signalkaskaden für die Zellfusion und die pathogene Entwicklung von *U. maydis*.** Nähere Informationen im Text. Blau: Komponenten des cAMP Signalwegs, grün: Komponenten der MAP-Kinase Kaskade; orange: Transkriptionsfaktoren; grau: Phosphatase Rok1; Pfeile: physikalische oder genetische Interaktionen; gestrichelte Pfeile: fehlende Komponenten bzw. Interaktion nicht nachgewiesen; rote gestrichelte Pfeile: mögliche Einflüsse der Pflanzenstimuli auf Signaltransduktionskomponenten (modifiziert nach Kahmann und Kämper, 2004).

### 3.6.1 Die Pheromon-abhängige MAPK ist essentiell für die pathogene Differenzierung

Für die morphologische Antwort auf den hydrophoben-, den Hydroxy-Fettsäure- und den Pheromonstimulus werden die MAPK Kpp2 und Crk1 benötigt; Kpp6 spielt hierfür keine Rolle. Wie der Pheromonstimulus vom Rezeptor an die MAPK-Kaskade (Abb. 39., grüne Elemente) vermittelt wird, ist nicht bekannt, gleiches trifft für den hydrophoben Stimulus zu [MENDOZA-MENDOZA *et al.*, 2009a]. Nach genetischer Aktivierung der MAPK Kpp2 in dem solopathogenen Stamm SG200 konnte die effiziente Bildung von septierten Filamenten und Appressorien auf hydrophober Oberfläche beobachtet werden [MENDOZA-MENDOZA *et al.*, 2009a]. Dies zeigt, dass eine Aktivierung dieser MAPK den Fettsäurestimulus ersetzen kann.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der MAPK Kpp2 in Flüssigkultur nicht ausreichend ist, um die Bildung von Appressorien zu induzieren.



Daher ist anzunehmen, dass zusätzlich zur Phosphorylierung von Kpp2 durch den Kontakt mit der hydrophoben Oberfläche weitere, bislang unbekannte Signaltransduktionskomponenten aktiviert werden (Abb. 39). DiStasio *et al.* (2009) konnten zeigen, dass die Phosphatase Rok1 die MAPK Kpp2 und Kpp6 dephosphoryliert (Abb. 39) und somit ein zentraler Regulator der pathogenen Differenzierung ist. Die dort beschriebenen Experimente zeigen, dass die Effizienz der Filament- und Appressorienbildung von der Phosphorylierung dieser MAPK abhängt. Ergebnisse, die zeigen, dass die Aktivierbarkeit von Kpp2 *in vivo* [MÜLLER *et al.*, 2003] Voraussetzung für die Appressorienbildung ist, unterstreichen diese Theorie. Dies spricht dafür, dass sowohl Hydrophobizität, als auch Hydroxy-Fettsäuren den Grad der Phosphorylierung von Kpp2 beeinflussen. Somit ist es wahrscheinlich, dass beide Stimuli in einen gemeinsamen Signalweg münden, in dem Kpp2 liegt, obwohl ihre Perzeption und Signalweiterleitung vermutlich unabhängig voneinander verlaufen.

### 3.6.2 Aktivierung des cAMP-Weges inhibiert Filament- und Appressorienbildung

Klose *et al.* (2004) beschrieben, dass in Zellen mit hoher PKA-Aktivität, wie sie z.B. durch die Zugabe von cAMP oder nach Deletion der regulatorischen PKA-Untereinheit *ubc1* entstehen, die Bildung von Lipid-induzierten Filamenten verhindert war. Auf hydrophoben Oberflächen hatte die Zugabe von cAMP einen starken inhibitorischen Effekt auf Filament- und Appressorienbildung in *U. maydis*. Dies könnte bedeuten, dass die cAMP Synthese nicht induziert wird, wenn in SG200 nach Zugabe von Hydroxy-Fettsäuren eine vermehrte Synthese von Pheromon erfolgt und das Pheromonsignal perzipiert wird. In haploiden Zellen führten Zugabe von cAMP oder Pheromon zu einer Induktion der Gene des *a*-Locus [KRÜGER *et al.*, 1998]. Möglicherweise erfolgt nach cAMP Zugabe eine Deregulation der beiden miteinander verknüpften cAMP und MAPK-Signalwegen. Eine starke Aktivierung des cAMP-Weges reprimiert Crk1 (Abb. 39) [GARRIDO UND PEREZ-MARTIN, 2003] und dies führt zum Verlust der *prf1* Expression [GARRIDO *et al.*, 2004]. Gleichzeitig kommt es zu einer Aktivierung des verbleibenden Prf1 Proteins durch PKA (Abb. 39) und somit zur Expression der Gene des *a*-Locus [KAFFARNIK *et al.*, 2003]. Falls das Hydroxy-Fettsäuresignal über den cAMP-Weg vermittelt wird, ist es wahrscheinlich, dass es nicht zu einem dauerhaften Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels kommt, da dies Crk1 reprimieren und Expression von *prf1* verhindern würde.

Eine Quantifizierung der cAMP Mengen nach Hydroxy-Fettsäure bzw. hydrophobem Stimulus könnten Aufschluss darüber geben, ob die camp-abhängige Signaltransduktion an der Vermittlung der beiden Stimuli beteiligt ist.

### 3.6.3 Das Zusammenspiel von MAPK- und cAMP- abhängiger

#### Signaltransduktion reguliert die Expression von *prf1*

Klose *et al.* (2004) konnten zeigen, dass in *U. maydis* die morphologischen Veränderungen, die durch Zugabe von Lipiden hervorgerufen werden, sowohl von cAMP- Signaltransduktion als auch von dem Pheromon MAPK Signalweg abhängen. Die Autoren beschreiben, dass sie die Bildung von Filamenten auch in *prf1* Deletionsmutanten beobachtet haben. Dies lässt zwei mögliche Erklärungen zu. Zum einen könnte es sein, dass Lipide und die hier getesteten Hydroxy-Fettsäuren direkt die MAPK-Kaskade und somit Kpp2 und Crk1 aktivieren. Die andere, wahrscheinlichere, Möglichkeit ist, dass es durch die Zugabe von Hydroxy-Fettsäuren zu einer Repression des cAMP Signalwegs kommt (Abb. 39, blaue Elemente), was wiederum zu einer stärkeren Aktivierung der Kpp2 Aktivität und somit der Transkription von *crk1* führen könnte [GARRIDO UND PEREZ-MARTIN, 2003]. Gegen die erste Möglichkeit spricht, dass in dieser Arbeit während der Kurzzeitinkubation mit Hydroxy-Fettsäuren keine Filamentbildung in der *prf1* Deletionsmutante festgestellt werden konnte, wobei nach Müller *et al.* (2003) durch Aktivierung der MAPK-Kaskade auch in dieser Mutante mit Zytoplasma gefüllte Filamente gebildet werden. Die Möglichkeit, dass die MAPK Crk1 aktiviert wird, wird durch das Resultat unterstützt, dass die Expression des Transkriptionsfaktors *prf1* durch Hydrophobizität aktiviert und durch Hydroxy-Fettsäuren weiter erhöht werden kann. Dies konnte direkt durch quantitative Real-Time Analysen der *prf1*-Expression gezeigt werden. Daher liegt der Schluss nahe, dass es durch den Kontakt mit der hydrophoben Oberfläche bereits zu einer Aktivierung des Kpp2-haltigen MAPK-Moduls kommt. Die beobachtete Induktion der Pheromon-Genexpression durch Hydroxy-Fettsäuren könnte durch eine posttranslationale Aktivierung von Prf1 durch den cAMP Signalweg oder die MAPK-Kaskade erfolgen.

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Pheromon die MAPK-Kaskade aktiviert und eine Aktivierung der MAPK-Kaskade einen Anstieg der Pheromon-Genexpression bewirkt [MÜLLER *et al.*, 1999; 2003]. Es ist sehr wahrscheinlich, dass in SG200 diese zusätzliche Aktivierung von Kpp2 durch kompatibles Pheromon die weitere Erhöhung der *prf1* Transkription verursacht, wie es in der Real-Time Expressionsanalyse zu erkennen ist. Erst kürzlich konnte auf transkriptioneller Ebene

gezeigt werden, dass die Expression Pheromon-abhängiger Gene zu einem Großteil von der Phosphorylierung von Prf1 durch die MAPK-Kaskade abhängt [ZARNACK *et al.*, 2008]. Die Expression von *prf1* unterliegt einer komplexen Regulation, da sie von Rop1 und einer „upstream activating sequence“ (UAS) induziert [BREFORT *et al.*, 2005; HARTMANN *et al.*, 1999] und von einem aktiven bE/bW-Heterodimer inhibiert wird [URBAN *et al.*, 1996].

### 3.6.4 Die Expression von *prf1* unterliegt einer komplexen Regulation

Der Transkriptionsfaktor Rop1 ist essentiell für die transkriptionelle Aktivierung von *prf1* nach Pheromon-Stimulus (Abb. 39) [BREFORT *et al.*, 2005]. Auf der Pflanzenoberfläche existieren jedoch weitere Stimuli die *U. maydis* wahrnehmen kann und die, Rop1-unabhängig, die *prf1* Transkription aktivieren können [BREFORT *et al.*, 2005]. Auf Parafilm konnte in dieser Arbeit die Bildung von septierten Filamenten und Appressorien in SG200 $\Delta$ rop1 beobachtet werden und kompatible haploide *rop1*-Deletionsstämme konnten unter den *in vitro* Bedingungen fusionieren. Dies zeigt, dass unter diesen Bedingungen die Pheromon-abhängige Signaltransduktion wiederhergestellt ist und somit die Gene für Pheromon und Rezeptor wieder exprimiert werden. Die Real-Time Daten zeigten, dass die *prf1* Transkriptmengen von SG200 und SG200 $\Delta$ rop1 auf nicht induzierendem Glas vergleichbar waren und nach Kontakt mit hydrophoben Oberflächen in beiden Stämmen die *prf1* Expression induziert wurde. Da Rop1 für die Expression von *prf1* nach Zugabe von Pheromon verantwortlich ist [BREFORT *et al.*, 2005], bedeutet dies, dass es durch den hydrophoben Stimulus zu einer Pheromon-unabhängigen Aktivierung der Kpp2-MAPK-Kaskade kommt. Dies wird durch das Resultat unterstrichen, dass SG200 $\Delta$ rop1 nicht in der Lage ist, nach Stimulation mit Hydroxy-Fettsäuren Filamente zu bilden. Diese Aktivierung von Kpp2 könnte zur Aktivierung von Crk1 führen und über einen bislang unbekannten Transkriptionsfaktor die *prf1*-Expression in Abwesenheit von *rop1* ermöglichen (Abb. 39). SG200 $\Delta$ rop1 reagierte nicht auf Hydroxy-Fettsäurestimulation. Dafür kommen zwei Ursachen in Frage. Zum einen könnte durch die Zugabe von Hydroxy-Fettsäuren in SG200 $\Delta$ rop1 Pheromon gebildet, jedoch nicht mehr wahrgenommen werden. Zum anderen könnte die Aktivierung der Pheromon-Genexpression ausbleiben. Ein Experiment, das Aufschluss über diese Fragen geben könnte, wäre die Inkubation von SG200 $\Delta$ rop1 mit Hydroxy-Fettsäuren in Anwesenheit eines Stammes, der zur Perzeption von Pheromon in der Lage ist, wie z.B. FB1, der zur besseren Unterscheidbarkeit konstitutiv GFP exprimieren sollte. Falls SG200 $\Delta$ rop1 nach Fettsäurestimulation

Pheromon sekretiert, würde FB1 Konjugationshyphen bilden. Die Frage, ob die Expression von *rop1* nach Fettsäurestimulation aktiviert wird, könnte die Fusion des *rop1* Promotors mit GFP im SG200 $\Delta$ rop1-Hintergrund beantworten. Solch ein Stamm könnte auch verwendet werden, um nach anderen Stimuli zu suchen, die die Transkription von *rop1* induzieren.

Das UAS-Element im Promotor von *prf1* war nur im SG200-Hintergrund essentiell für Appressorienbildung, jedoch nicht für die Bildung von septierten Filamenten und die Expression von *prf1*. Es könnte also ein möglicher Schwellenwert der *prf1* Expression existieren, der in SG200 $\Delta$ UAS nicht erreicht wird. Möglicherweise wird die *prf1* Expression nach Induktion der Gene des *b*-Lokus entscheidend reprimiert. Somit könnte die *prf1* Expression nicht mehr für die Ausbildung von Appressorien auf hydrophoben Oberflächen und auf der Pflanze, sowie die Bildung von Filamenten auf aktivkohlehaltigem Medium und nach Stimulation mit Hydroxy-Fettsäuren ausreichen. Eine mögliche Erklärung für den Unterschied zwischen kompatiblen haploiden Stämmen und SG200 ist die Tatsache, dass das aktive bE/bW-Heterodimer erst nach der Fusion vorhanden ist. Somit könnte, da die Repression von *prf1* erst später erfolgt, trotz UAS-bedingt, geringerer Expression genügend Prf1 vorhanden sein, um die Appressorienbildung zu ermöglichen. Da die Deletion der UAS in FB1 und FB2 keinen Effekt hat, ist es unwahrscheinlich, dass die UAS direkt an der Transduktion des Pheromon-Signals beteiligt ist.

### **3.6.5 Unterschiede und Gemeinsamkeiten von *U. maydis* mit anderen pilzlichen Pathogenen in den pathogenitätsrelevanten Signal-Komponenten**

Die Pheromon-abhängige MAPK-Kaskade von *U. maydis* ist in allen bisher untersuchten pflanzenpathogenen Pilzen funktionell konserviert. Die Kpp2 Homologe (PMK1: *M. grisea*; CMK1: *C. lagenarium*; BMP1: *B. cinerea*) werden, genau wie in *U. maydis*, für die morphologische Antwort auf induktive Oberflächen benötigt [XU *et al.*, 1996; ZHENG *et al.*, 2000; TAKANO *et al.*, 2000; ZHAO *et al.*, 2005]. Für CMK1 ist es ebenfalls höchst wahrscheinlich, dass die Aktivierung vergleichbar abläuft, da diese MAPK PMK1 funktionell komplementieren kann [TAKANO *et al.*, 2000]. Im Gegensatz zu der Situation in *U. maydis*, wo die Zugabe von cAMP die durch Oberflächensignale induzierte Differenzierung inhibiert, konnte in *M. grisea* durch pharmakologische Experimente *in vitro* gezeigt werden, dass in einer Mutante, die in der Appressorienbildung gestört ist, durch Aktivierung des cAMP/PKA bzw. des DAG/PKC Signalweges die Appressorienbildung wiederhergestellt werden konnte

[SKAMINOTI UND GURR, 2007]. Auch in anderen pflanzenpathogenen Pilzen wie *C. lagenarium* und *B. cinerea* konnte eine Aktivierung von PKA mittels cAMP Zugabe den Phänotyp der jeweiligen MAPK Deletionsmutante im Hinblick auf Appressorienbildung komplementieren [YAMAUCHI *et al.*, 2004; DOEHLEMANN *et al.*, 2006]. Diese Ergebnisse deuten an, dass zwar der MAPK Signalweg zwischen den o.g. Pilzen und *U. maydis* konserviert ist, jedoch die Verknüpfung zwischen cAMP und MAPK-Weg unterschiedlich ist.

Der Fettsäure-Stimulus konnte in dieser Arbeit bereits hinsichtlich seiner Wirkung auf die Aktivierung einige MAPK untersucht werden. Nach Zugabe von 16-Hydroxypalmitinsäure konnte eine spezifische Phosphorylierung des Homologs der MAPK Hog1 festgestellt werden. Die Relevanz dieser Phosphorylierung konnte jedoch nicht geklärt werden, da die nötigen Deletionsmutanten nicht erzeugt werden konnten (A. Mendoza-Mendoza, pers. Mitteilung). In anderen pilzlichen Pathogenen, wie *B. cinerea* [SEGMÜLLER *et al.*, 2007], *C. albicans* [ALONSO-MONGE *et al.*, 1999] und *C. neoformans* [BAHN *et al.*, 2005; 2006] konnte bereits gezeigt werden, dass die Homologen dieser MAPK für die Differenzierung der pathogenen Form essentiell sind. Die Beobachtung, dass die Phosphorylierung von Hog1 in *U. maydis* spezifisch nach Inkubation mit induzierenden Hydroxy-Fettsäuren beobachtet werden konnte, legt den Schluss nahe, dass diese Signaltransduktions-Komponente an der Integration des Fettsäurestimulus beteiligt ist. Der Signalanstieg nach 5 min Inkubationszeit in Gegenwart von Palmitinsäure wurde in Proben, die später genommen wurden, nicht mehr beobachtet. Diese Inkonsistenz könnte durch eine Unregelmäßigkeit bei der Probennahme oder der eingesetzten Proteinmenge entstehen oder nach Inkubation mit Palmitinsäure kommt es lediglich zu einer inkonsistenten Phosphorylierung von Hog1.

### 3.7 Die frühe transkriptionelle Antwort von *U. maydis* auf Hydrophobizität und Hydroxy-Fettsäuren

Ziel der in dieser Arbeit durchgeführten Transkriptomanalyse mit SG200AM1 war es, die frühe transkriptionelle Antwort auf Hydroxy-Fettsäuren und Hydrophobizität zu beobachten. Hierfür wurde das Transkriptprofil von Zellen, die in Kontakt mit einer hydrophoben Oberfläche waren mit solchen verglichen, die sich auf einer Glasoberfläche befanden. Da Zellen auf Glas jedoch nicht oder nur schwach haften, gab es keine Möglichkeit, zwischen Zellen, die tatsächlich Oberflächenkontakt hatten und solchen, die sich im Überstand befunden haben, zu unterscheiden. Deshalb wurden alle Zellen in den jeweiligen Proben für die Transkriptomanalyse verwendet. Ein weiteres Problem des experimentellen Ansatzes war es, dass die verwendeten Zellen nicht synchronisiert werden konnten. Diese Faktoren führten dazu, dass schwach exprimierte Gene und solche, die nur geringer Regulation unterliegen in dieser Arbeit nicht als signifikant reguliert identifiziert werden konnten.

Um die in der Transkriptomanalyse gewonnenen Daten besser beurteilen zu können, wurde in den auf Parafilm bzw. Parafilm mit 16-Hydroxypalmitinsäure induzierten Genen nach bereits untersuchten Genen gesucht, die in Verbindung mit Filamentbildung und pathogener Entwicklung stehen. Bereits nach vier Stunden konnten die bekannten *b*-regulierten Gene *dik6* [BOHLMANN *et al.* 1994] und *rep1* [WÖSTEN *et al.*, 1996] als induziert identifiziert werden. Die erwartete Induktion von *mfa1*, *pra1* und *prf1* konnte nicht festgestellt werden. Dieses Ergebnis widerspricht den durchgeführten Real-Time PCR-Analysen (für *prf1*), die unter gleichen Bedingungen durchgeführt wurden. Eine mögliche Erklärung dafür ist die geringe Expressionsstärke von *prf1*. Verglichen mit der Transkriptomanalyse ist die qPCR sensitiver und gerade bei gering exprimierten Genen sicherlich die bessere Detektionsmethode.

Überraschenderweise konnte in einem Vergleich der Transkriptom-Daten von Zellen, die auf Parafilm inkubiert wurden mit denen, die zusätzlich noch mit 16-Hydroxypalmitinsäure behandelt wurden, keine signifikante differentielle Regulation von Genen beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung dafür ist die bereits angesprochene geringe Sensitivität in dem hier verwendeten System. Eine andere Erklärung ist, dass die Zellen mit und ohne Fettsäurebehandlung auf Parafilm nach vier und acht Stunden Filamente bilden, jedoch zu diesem Zeitpunkt noch keine Appressorien differenzierten. In der Appressorienbildung wurde jedoch der größte

Unterschied zwischen Hydroxy-Fettsäure behandelten und unbehandelten Zellen beobachtet.

### **3.7.1 Hydrophobizität und Hydroxy-Fettsäuren führen zu einer Repression von Genen des Kohlenstoff-Metabolismus**

Alle regulierten Gene wurden hinsichtlich einer signifikanten Anreicherung bestimmter funktioneller Gruppen hin untersucht. Die einzige feststellbare Anreicherung in einer funktionellen Kategorie (nach FunCat-Klassifizierung, siehe Material und Methoden) konnte im Kohlenstoff-Metabolismus beobachtet werden. Hierbei konnte eine Repression von 25 Genen dieser funktionellen Kategorie nach vier bzw. acht Stunden Inkubation auf hydrophober Oberfläche in Anwesenheit von 16-Hydroxypalmitinsäure festgestellt werden. Eine Ursache für die Repression dieser Gene könnte die Arretierung des Zellzyklus in der G2-Phase während der pathogenen Differenzierung sein. Eine direkte Verbindung zwischen Zellzyklusarrest und Metabolismus wurde bisher jedoch nicht gezeigt [GARCÍA-MUSE *et al.*, 2003, SGARLATA UND PÉREZ-MARTÍN, 2005]. Eine andere Ursache könnte sein, dass Zellen, die auf der hydrophoben Oberfläche differenzieren, für Filamentbildung und Produktion der adhäsiven Matrix [SNETSELAAR UND MIMS, 1992] Energie benötigen. Das bedeutet, sie verbrauchen dabei die gespeicherten Kohlenstoffquellen schneller, als Zellen die auf der Glasoberfläche inkubiert werden und nicht differenzieren.

Betrachtet man die Cluster-Analyse differentiell regulierter Gene des Kohlenstoff-Metabolismus (Abb. 37), zeigen sich drei Hauptcluster. Die sieben Gene des ersten Clusters werden bereits nach vier Stunden auf Parafilm reprimiert. Dieser Cluster enthält unter anderem zwei verwandte ABC-Transporter (55,5% Aminosäureidentität) um05642 und um02796 und einen putativen Carbonsäure-Transporter (um00529). Weiter fanden sich 3 Oxidoreduktasen (um10062, um10605 und um02172) und eine Lyase (um10175). Die Expression der 14 Gene des zweiten Clusters ist bereits nach acht Stunden auf Glas leicht reprimiert, die Repression ist jedoch nach acht Stunden auf Parafilm deutlich stärker und kann durch Zugabe von 16-Hydroxypalmitinsäure bereits nach vier Stunden auf Parafilm beobachtet werden. Dieser Cluster enthält neben dem Zuckertransporter STL1 vier Oxidoreduktasen (um04873, um05170, um04922 und um10682), drei Transferasen (um02715, um01885 und um01835) zwei Hydrolasen (um11549 und um02300), zwei Lyasen (um03994 und um05130) und eine Isomerase (um03006). Die fünf Gene des dritten Clusters sind erst nach acht Stunden Inkubation auf Parafilm reprimiert. Darunter sind ein Vitamin H

Transporter (um11172), eine Oxidoreduktase (um02215), eine Transferase (um12026), eine Lyase (um01005) und eine Ligase (um04629).

### **3.7.2 Hydrophobizität und Hydroxy-Fettsäuren induzieren fünf verschiedene Klassen von Genen, die für sekretierte Proteine codieren**

Nach Abgleich der induzierten Gene, konnte keine Anreicherung von Genen in einer funktionellen Kategorie beobachtet werden. In der Gruppe der nach hydrophobem Stimulus mit und ohne Hydroxy-Fettsäure induzierten Gene fand sich ab einer Inkubationsdauer von vier Stunden eine hoch-signifikante Anreicherung von Genen, die für putativ sekretierte Proteine kodieren [MÜLLER *et al.* 2008a]. Diese Gene wurden hinsichtlich ihrer möglichen Funktion betrachtet, und dabei zeigten sich fünf Hauptkategorien, denen diese Gene zugeordnet werden konnten:

#### **3.7.2.1 Proteine mit einer Funktion in der Polymermodifikation**

Eine Gruppe von sechs Genen besitzt eine mögliche Funktion in der Polymermodifikation. Sie umfasst zwei Proteasen (um03024, um00411) und zwei Peptidasen (um06116, 03947), einer putative Ribonuklease (um10881) und eine Lipase (um01422). Eine mögliche Funktion der Proteasen und Peptidasen wäre eine Beteiligung an der Unterdrückung der Abwehrreaktion der Wirtspflanze. Dies geschieht, in dem z.B. pflanzliche Chitinasen und Glucanasen, die die Pilzzellwand abbauen, inhibiert werden [SEXTON UND HOWLETT, 2006]. Dies verhindert gleichzeitig die Freisetzung von pilzlichen Zellwandkomponenten, Elicitoren der pflanzlichen Abwehr [BUCHANAN *et al.*, 2000]. Die Ribonuklease um10881 wurde auf Parafilm mit und ohne Hydroxy-Fettsäure nach vier bzw. acht Stunden induziert und ist in den in dieser Arbeit durchgeführten Transkriptom-Analysen eines der am stärksten regulierten Gene (vgl. Tab 2 und 3). Um10881 weist eine hohe Sequenzhomologie zu Guanyl-spezifischen Ribonukleasen (RNase T1) von *Penicillium* (47% Aminosäureidentität) und *Aspergillus* (49% Aminosäure-Identität) Spezies auf. RNase T1, ein pilzliches Ribotoxin, kann internalisiert werden, da sie mit Phospholipid-Membranen interagieren [MATRINEZ-RUIZ *et al.*, 2001; LACADENA *et al.*, 2007] und anschließend endozytiert werden [LACADENA *et al.*, 2007]. Die toxische Aktivität besteht darin, eine bestimmte Phosphodiester-Bindung in der großen rRNA, den Saricin-Ricin-Loop zu zerschneiden [PEREZ-CANADILLAS *et al.*, 2002]. Es ist denkbar, dass dieses Toxin von *U. maydis* sekretiert wird, um eventuelle



Konkurrenten auf der Wirtsoberfläche zu eliminieren. Dies könnte von Bedeutung sein, da *U. maydis* nach der Penetration die Abwehrreaktion der Pflanze lokal unterdrückt [DOEHLEMAN *et al.*, 2008b], und davon andere Mikroorganismen profitieren könnten. Alternativ wäre es auch möglich, dass um10881 von Pflanzenzellen aufgenommen wird und pflanzliche RNA abbaut, um eine transkriptionelle Antwort der Pflanze auf Pilzbefall zu unterdrücken [MÜLLER *et al.*, 2008a]. Die Zytotoxizität von RNaseT1 jedoch mit apoptotischen Zelltod einhergeht [MATRINEZ-RUIZ *et al.*, 2001] der nach Kolonisation mit *U. maydis* nicht beobachtet wird [DOEHLEMAN *et al.*, 2008b], wird diese Alternative als unwahrscheinlich erachtet. Die Induktion der Lipase um01422 wurde nach acht Stunden auf Parafilm mit und ohne Hydroxy-Fettsäure beobachtet. Lipasen sind Serin Esterasen die an der Grenzfläche zwischen einem hydrophoben Lipid-Substrat und einem hydrophilen Medium wie Wasser aktiv sind, indem sie wasserunlösliche Glyzeride scheiden [JAEGER *et al.*, 1999]. Somit könnte um01422 eine Rolle in der Adhäsion auf der Pflanzenoberfläche oder der Penetration spielen, indem es die Wachsschicht auf der Cuticula auflöst oder durch die Esteraseaktivität zur enzymatischen Penetration der Cuticula beiträgt. Lipasen wurden bereits in einigen pilzlichen Pathogenen untersucht. In *Candida parapsilosis* konnte der Lipase-Lokus deletiert werden, was zu einer Reduktion der Virulenz führte [GÁCSEK *et al.*, 2007]. Das einzige beschriebene Beispiel, in dem die Deletion einer Lipase in einem Pflanzenpathogen zu einer reduzierten Virulenz führte, wurde in *Fusarium graminearum* beschrieben [VOIGT *et al.*, 2005]. Jedoch blieb die Deletion von extrazellulären Lipasen in *B. cinerea* [VAN KAN *et al.*, 1997, REIS *et al.*, 2005], *Candida albicans* und *Nectria haematococca* [EDDINE *et al.*, 2001; FU *et al.*, 1997] ohne Effekt auf die Pathogenese. Lipaseaktivität scheint also nicht in allen pathogenen eine Rolle in der Virulenz zu spielen.

### 3.7.2.2 Chitin-Modifizierende Proteine

Die zweite Gruppe von sekretierten Proteinen ist vermutlich an der Modifikation der Zellwand von *U. maydis* beteiligt, die für den Übergang von hefeartigem Wachstum zu filamentösem Wachstum benötigt wird [RUIZ-HERRERA *et al.*, 1996]. In *U. maydis* wurden 9 Gene vorhergesagt, die für Zellwand modifizierende Enzyme kodieren [MÜLLER *et al.*, 2008a]. Fünf dieser Gene (um04364, um00876, um 06190, um01788 und um 02758) waren nach hydrophobem Stimulus mit und ohne Hydroxy-Fettsäure induziert. Zwei dieser Gene (um04364 und um00876), kodieren für  $\beta$ -1,3-Glucanasen. Zwei für putative Chitinasen (um06190 und um02758) und ein Gen für

eine putative Chitindeacetylase (um01788). Die Induktion dieser fünf Chitin-Modifizierenden Gene geht vermutlich mit Änderungen in der Zellwandzusammensetzung einher, die entstehen, wenn die hefeartigen Sporidien zu filamentösen Zellen differenzieren [RUIZ-HERRERA *et al.*, 1996]. Weiterhin sind Bestandteile der Pilzzellwand wie N-Acetyl-Glukosamin-Oligomere oder N-Acetyl-Glukosamin-Glukane Elicitoren, die die pflanzliche Abwehr induzieren können [FELIX *et al.*, 1993; NÜRNBERGER *et al.*, 1994; VANDER *et al.*, 1998]. Daher ist es nötig, dass der Pilz seine Chitinzellwand mit Hilfe von Chitin-Deacetylasen modifiziert [DEISING UND SIEGRIST, 1995].

### 3.7.2.3 Zellwandassoziierte Proteine

Die dritte Gruppe von induzierten sekretierten Proteinen bildeten drei Zellwandproteine. Die Gene um00891 und um00330 kodieren für Utr2-ähnliche Proteine [MELNIK UND SHERMAN, 1993] ohne vorhergesagten GPI-Anker [<http://gpi.unibe.ch/>; FANKHAUSER UND MÄSER, 2005; MÜLLER *et al.*, 2008a] und waren unter Filamentbildung induzierenden Bedingungen nach 4 Stunden hochreguliert (Tab. 2). Außerdem wurde eine signifikante Induktion des Gens *rep1* (um03924) beobachtet (Tab. 3).

Das Ortholog zu um00891 und um00330, ist die Glykosyltransferase Crh2p (36% Aminosäureidentität) aus *S. cerevisiae* die beiden Gene besitzen eine geringere Homologie zu der Glykosyltransferase Crh1p (28% Aminosäureidentität). Crh2p wird für die Quervernetzung von Chitin mit  $\beta$ -1,6 Glucan in der Zellwand benötigt indem Crh2p Chitinketten auf  $\beta$ -1,6 Glucan transferiert [CABIB *et al.*, 2008]. Diese Quervernetzung ist ein wichtiger Faktor für die Zellwandintegrität und ihrer Aufrechterhaltung [CABIB *et al.*, 2007]. In *Candida albicans* führt die Deletion des Utr2 Orthologs CSF4 zu einem Filamentationsdefekt und einer Reduktion der Adhäsion [ALBERTI-SEGUI *et al.*, 2004]. Vergleichbare Funktionen sind auch für die Orthologen in *U. maydis* denkbar.

Das Gen *rep1* kodiert für die Oberflächenproteine Rep1-1 bis Rep1-11 und wird nach *b*-Induktion exprimiert [WÖSTEN *et al.*, 1996]. Die Rep-Proteine erfüllen die Funktion von Hydrophobinen, indem sie auf der Zellwand assemblieren, die Hyphenoberfläche hydrophob machen und die Anheftung an hydrophobe Oberflächen vermitteln [TEERSTRA *et al.*, 2006]. Die mRNA von *rep1* findet sich in der Wachstumsregion in der Spitze von Filamenten, und die Proteine werden als Fibrillen in die Zellwand eingelagert [TEERSTRA *et al.*, 2009]. Daher ist es stimmig, dass in den hier

durchgeführten Experimenten unter Filamentbildung induzierenden Bedingungen, die Expression dieses Gens induziert war.

#### **3.7.2.4 Proteine mit sonstiger enzymatischer Funktion**

Eine weitere Gruppe von 10 Genen die für sekretierte metabolische Enzyme kodiert, war ebenfalls induziert (Tab. 2 und 3). Jedoch ergaben bioinformatische Analysen, mit Ausnahme der Glukose-Oxidasen um02157 und um03615, aufgrund geringer Homologie hier keine sicheren Anhaltspunkte um eine Funktion der Genprodukte vorhersagen zu können [MÜLLER *et al.*, 2008a]. Die übrigen Gene kodiert für eine putative Oxidase (um00913, um04533), eine Esterase (um04247), ein Lysozym (um02727), eine Metallo-Protease (um10068), eine Phosphatase (um05995) und eine Mannosidase (um01957). Die genaue Funktion dieser Enzyme bedarf der weiteren Erforschung, jedoch wird deutlich, dass ein breites Spektrum an Enzymen bereits in dieser frühen Phase der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* sekretiert werden könnte.

#### **3.7.2.5 Proteine ohne Homologie zu anderen bekannten Proteinen in den Datenbanken**

Eine weitere Gruppe von 18 Genen, deren Produkte keine Homologie zu bekannten Genen aufweisen, wurde ebenfalls induziert. Diese Proteine besitzen ein Sekretionssignal [MÜLLER *et al.*, 2008a]. Im Zuge des *U. maydis* Genomprojekts konnten zwölf Cluster identifiziert werden, die Gene tragen, die für kleine, sekretierte Proteine kodieren [KÄMPER *et al.*, 2006]. Eine Expressionsanalyse dieser Gene zeigte, dass die meisten dieser während des invasiven Wachstums im Pflanzengewebe induziert sind [KÄMPER *et al.*, 2006]. Die Deletion von fünf dieser Cluster zeigte, dass die entsprechenden Gene für die Virulenz von *U. maydis* von Bedeutung sind. Für zwei Effektoren konnte inzwischen gezeigt werden, dass sie die pflanzliche Abwehr unterdrücken [K. Schipper und R. Kahmann, pers. Mitteilung; DOEHLEMAN *et al.*, 2009]. In diesem hier untersuchten frühen Stadium war nur eines aus Cluster 2B (um01297, siehe Tab. 3) signifikant induziert. Die anderen Gene liegen nicht in Clustern vor. Es ist möglich, dass auch einige der hier identifizierten Gene für Effektoren kodieren, die pflanzliche Abwehr unterdrücken, indem sie beispielsweise pflanzliche Proteasen inhibieren oder den Zelltod der Pflanzenzelle unterdrücken. Weiter wäre denkbar, dass einige dieser Proteine ein Bestandteil der extrazellulären Matrix sind, die die Hyphen während des Wachstums auf der Pflanzenoberfläche umgibt [SNETSELAAR UND MIMS, 1993]. Die Zusammensetzung

der extrazellulären Matrix wird zurzeit durch Massenspektrometrie unter Zuhilfenahme des hier beschriebenen *in vitro* Systems untersucht (A. Djamei und R. Kahmann, persönl. Mitteilung).

In der hier durchgeführten Transkriptomanalyse wurde keine Induktion der putativen Cutinasen [MÜLLER *et al.*, 2008a] beobachtet, obwohl anzunehmen ist, dass Cutinase-Aktivität während der Differenzierung von *U. maydis* auf der Blattoberfläche benötigt wird. Da die Induktion von Cutinasen in den untersuchten Fällen durch Cutin induziert wird [BAJAR *et al.*, 1991; HAWTHORNE *et al.*, 2001], könnte es sein, dass das induzierende Signal unter *in vitro* Bedingungen nicht vorhanden ist. Alternativ wäre es möglich, dass diese Enzyme erst kurz vor der Appressorienbildung induziert werden. Außerdem ist denkbar, dass andere Enzyme, wie z.B. die unter *in vitro* Bedingungen induzierte unspezifische Esterase (um04247) oder die Lipase (um01422) die Hydroxy-Fettsäuren aus der Cuticula lösen, die dann eine Verstärkung der Appressorienbildung bewirken könnten.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Transkriptomanalyse brachte einige interessante Ergebnisse, die Hinweise auf die frühen Prozesse geben, die während der Filamentbildung und dem initialen Kontakt mit der Wirtspflanze ablaufen. Vor allem die funktionelle Charakterisierung der verschiedenen sekretierten Proteine mit bislang unbekannter Funktion könnte Aufschluss darüber geben, welche Moleküle die Kommunikation zwischen Pilz und Pflanze schon vor der Penetration der Cuticula steuern.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material und Bezugsquellen

#### 4.1.1 Medien, Lösungen, Enzyme und Kits

##### 4.1.1.1 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren p. a. Qualität und wurden von den Firmen Ambion, Sigma-Aldrich, Merck, Fluka, Riedel-de-Haën, Gerbu, Seakem, Duchefa, Difco, Serva, BioRad, Amersham, Pharmacia, Invitrogen und Carl-Roth bezogen; Für weitere Einzelheiten siehe [Brachmann, 2001].

##### 4.1.1.2 Puffer und Lösungen

Standard-Puffer und Lösungen wurden nach AUSUBEL *et al.* (1987) und SAMBROOK *et al.* (1989) hergestellt. Spezielle Puffer und Lösungen sind unter den jeweiligen Methoden aufgeführt.

##### 4.1.1.3 Enzyme

Restriktionsenzyme wurden von NEB Biolabs bezogen, alle übrigen Enzyme von Roche mit Ausnahme der reversen Transkriptasen von (Invitrogen), der Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) und Taq DNA-Polymerase (Laborpräparation/Fermentas).

##### 4.1.1.4 Verwendete Kits und sonstiges Material

Folgende Kits wurden verwendet: QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) zur Elution von DNA aus Agarose-Gelen, MinElute PCR Purification Kit und QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) zur Aufreinigung von PCR-Reaktionen und anderen Enzymreaktionen, QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) zur Aufreinigung von Plasmiden sowie das TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) zur Klonierung von PCR-Produkten, GeneChip Expression 3'-Amplification One-Cycle cDNA Synthesis Kit (Affymetrix), SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen), Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen), NEBlot Kit (NEB Biolabs) zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten, BigDye Kit (ABI) zur fluoreszenzmarkierten Sequenzierung, Microspin S-200 und S-300 Säulen (Amersham Pharmacia Biotech) zur Aufreinigung von radioaktiv markierten DNA-Sonden. Weiteres verwendetes Material ist unter den jeweiligen Methoden beschrieben.

##### 4.1.1.5 Medien

Für die Kultivierung von *E. coli* wurden dYT Flüssigmedium und YT-Festmedium verwendet (Ausubel *et al.*, 1987; Sambrook *et al.*, 1989). Ampicillin wurde in einer Konzentration von 100 µg/ml eingesetzt. Für die Kultivierung von *U. maydis* wurden folgende Medien verwendet, die wenn nicht anders angegeben, 5 min bei 121 °C autoklaviert wurden.

<b>AM-Minimalmedium:</b>	<p>3 g <math>(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4</math>          62,5 ml Salz-Lösung          in 980 ml <math>\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}</math>          mit NaOH auf pH 7,0 (mit HCl auf pH 3,0)          nach dem Autoklavieren:          20 ml 50 % (w/v) Glucose (f. c. 1%), sterilfiltriert</p>
<b>NM-Minimalmedium:</b>	<p>3 g <math>\text{KNO}_3</math>          62,5 ml Salz-Lösung          in 980 ml <math>\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}</math>          mit NaOH auf pH 7,0          nach dem Autoklavieren:          20 ml 50 % (w/v) Glucose (f. c. 1%), sterilfiltriert</p>
<b>CM-Vollmedium:</b> (Holliday, 1974)	<p>6 g <math>\text{NH}_4\text{NO}_3</math>          10 g Casamino Acids          1 g DNA          2 g Yeast Extract          20 ml Vitamin-Lösung          250 ml Salzlösung          in 980 ml <math>\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}</math>          mit NaOH auf pH 7,0          nach dem Autoklavieren:          20 ml 50 % (w/v) Glucose (f. c. 1%), sterilfiltriert</p>
<b>PD-Charcoal:</b>	<p>24 g Potato-Dextrose Broth          10 g Aktivkohle          in 1 l <math>\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}</math>          autoklaviert</p>
<b>Regenerations-Agar:</b> (Schulz <i>et al.</i> , 1990)	<p>Top: 1,5 % (w/v) Bacto-Agar          1 M Sorbitol          in YEPSL          Bottom: wie Top, zusätzlich doppelt          konzentriertes Antibiotikum</p>
<b>Salzlösung:</b> (Holliday, 1974)	<p>16 g <math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math>          4 g <math>\text{Na}_2\text{SO}_4</math>          8 g KCl          4 g <math>\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}</math>          1,32 g <math>\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}</math>          8 ml Spurenelement-Lösung          in 1 l <math>\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}</math>          sterilfiltriert</p>
<b>Spurenelementlösung:</b>	<p>60 mg <math>\text{H}_3\text{BO}_3</math>          140 mg <math>\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}</math>          400 mg <math>\text{ZnCl}_2</math>          40 mg <math>\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}</math>          100 mg <math>\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}</math>          40 mg <math>\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}</math>          in 1 l <math>\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}</math></p>

sterilfiltriert

**Vitaminlösung:**  
(Holliday, 1974)

100 mg Thiamin  
 50 mg Riboflavin  
 50 mg Pyridoxin  
 200 mg Kalziumpantothenat  
 500 mg para-Aminobenzoessäure  
 200 mg Nikotinsäure  
 200 mg Cholinchlorid  
 10000 mg myo-Inositol  
 in 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>  
 sterilfiltriert

**YEPSL:**

(modifiziert nach Tsukuda et al., 1988)

10 g Yeast Extract  
 10 g Pepton  
 10 g Saccharose  
 in 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>  
 autoklaviert

Für Medien mit Arabinose als einziger Kohlenstoffquelle wurde nach dem Autoklavieren Arabinose statt Glucose in einer Endkonzentration von 1 % zugegeben. Für Festmedien wurde Bacto- Agar in einer Endkonzentration von 2 % zugegeben. Medienzusätze wurden, soweit nicht anders vermerkt, in folgenden Konzentrationen eingesetzt: Carboxin (2 µg/ml), Hygromycin (200 µg/ml), ClonNAT (150 µg/ml).

## 4.2 Stämme, Oligonukleotide und Vektoren

### 4.2.1 *E. coli*-Stämme

Für alle Experimente wurde der Stamm TOP10 (Invitrogen) benutzt, ein *E. coli* K12 Derivat mit dem Genotyp: F-, *mcrA*,  $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ ,  $\Phi80lacZ\Delta M15$ ,  $\Delta lacX74$ , *deoR*, *recA1*, *araD139*,  $\Delta(ara-leu)7697$ , *galU*, *galK*, *rpsL*(StrR), *endA1*, *nupG*.

### 4.2.2 Maisvarietäten (*Zea mays* spec.)

Für alle Pflanzenspritzinfektionen wurde die Maisvarietät Early Golden Bantam (Olds Seed Company, Madison, Wisconsin, USA) verwendet.

### 4.2.3 *U. maydis*-Stämme

In diesem Kapitel werden die verwendeten *U. maydis* Ausgangsstämme (Tabelle 4), sowie die in dieser Arbeit hergestellten Stämme (Tabelle 5), beschrieben.

Tabelle 4: Verwendete Stämme

Name	Genotyp	Resistenz	Referenz
FB1	<i>a1 b1</i>	-	BANNUETT UND HERSKOWITZ, 1989
FB2	<i>a2 b2</i>	-	BANNUETT UND HERSKOWITZ, 1989
SG200	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i>	Phleo <sup>R</sup>	KÄMPER <i>et al.</i> , 2006
SG200AM1	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> <i>ip</i> <sup>r</sup> [ <i>P</i> <sub>um01779</sub> : <i>3eGFP</i> ] <i>ip</i> <sup>s</sup>	Phleo <sup>R</sup> Cbx <sup>R</sup>	MENDOZA-MENDOZA <i>et al.</i> , 2009a
SG200AM1- RFP	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> <i>ip</i> <sup>r</sup> [ <i>P</i> <sub>um01779</sub> : <i>3eGFP</i> ] <i>ip</i> <sup>s</sup> <i>P</i> <sub>otef</sub> : <i>2RFP</i>	Phleo <sup>R</sup> Cbx <sup>R</sup>	MENDOZA-MENDOZA <i>et al.</i> , 2009a
SG200Δrop1	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> Δ <i>rop1</i>	Phleo <sup>R</sup> Hyg <sup>R</sup>	BREFORT <i>et al.</i> , 2005
SG200Δprf1	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> Δ <i>prf1-1</i>	Phleo <sup>R</sup> Hyg <sup>R</sup>	A. Hartmann Stammsammlung, HA89
SG200kpp2 <sup>AEF</sup>	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> <i>kpp2</i> <sup>T182A,Y184F</sup>	Phleo <sup>R</sup> Nat <sup>R</sup>	MÜLLER <i>et al.</i> , 2003
SG200kpp6 <sup>AEF</sup>	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> <i>kpp6</i> <sup>T355A,Y357F</sup>	Phleo <sup>R</sup> Cbx <sup>R</sup>	Brachmann <i>et al.</i> , 2003
SG200Δcrk1	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> Δ <i>crk1</i>	Phleo <sup>R</sup> Hyg <sup>R</sup>	A. Mendoza-Mendoza, persönl. Mitteilung
FB1 Pmfa1:GFP	<i>a1 b1</i> <i>ip</i> <sup>r</sup> [ <i>P</i> <sub>mfa1</sub> : <i>eGFP</i> ] <i>ip</i> <sup>s</sup>	Cbx <sup>R</sup>	M. Feldbrügge, persönl. Mitteilung
FB1AM1	<i>a1 b1</i> <i>ip</i> <sup>r</sup> [ <i>P</i> <sub>um01779</sub> : <i>3eGFP</i> ] <i>ip</i> <sup>s</sup>	Cbx <sup>R</sup>	MENDOZA-MENDOZA <i>et al.</i> , 2009a
FB1GFP	<i>a2 b2</i> <i>ip</i> <sup>r</sup> [ <i>P</i> <sub>otef</sub> : <i>3eGFP</i> ] <i>ip</i> <sup>s</sup>	Cbx <sup>R</sup>	M. diStasio, persönl. Mitteilung
FB2RFP	<i>a2 b2 ip</i> <sup>r</sup> [ <i>P</i> <sub>otef</sub> : <i>2RFP</i> ] <i>ip</i> <sup>s</sup>	Cbx <sup>R</sup>	MENDOZA-MENDOZA <i>et al.</i> , 2009a
SG200FAM1/ paAM1	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> <i>ip</i> <sup>r</sup> [ <i>P</i> <sub>crg1</sub> : <i>fuz7DD</i> ] <i>ip</i> <sup>s</sup> paAM1	Phleo <sup>R</sup> Cbx <sup>R</sup> Nat <sup>R</sup>	MENDOZA-MENDOZA <i>et al.</i> , 2009a



**Tabelle 5: In dieser Arbeit hergestellte Stämme**

Bezeichnung	Genotyp	Resistenz	Ausgangsstamm
AB33AM1	<i>a2 P<sub>nar</sub>:bW2,bE1</i> <i>paAM1</i>	Phleo <sup>R</sup> Nat <sup>R</sup>	AB33, BRACHMANN <i>et al.</i> , 2001
FB1Δrop1 GFP	<i>a1 b1</i> <i>ip'[P<sub>otef</sub>:3eGFP]ip<sup>s</sup></i>	Hyg <sup>R</sup> Cbx <sup>R</sup>	FB1Δrop1, BREFORT <i>et al.</i> , 2005
FB2Δrop1 RFP	<i>a2 b2</i> <i>ip'[P<sub>otef</sub>:2RFP]ip<sup>s</sup></i>	Hyg <sup>R</sup> Cbx <sup>R</sup>	FB2Δrop1, BREFORT <i>et al.</i> , 2005
SG200Δrop1- AM1	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> <i>Δrop1</i> <i>ip'[P<sub>um01779</sub>:3eGFP]ip<sup>s</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> Hyg <sup>R</sup> Cbx <sup>R</sup>	SG200Δrop1, BREFORT <i>et al.</i> , 2005
FB1ΔUAS	<i>a1 b1 ΔP<sub>prf1</sub>(-1509 bp</i> <i>bis -1589 bp)</i>	Nat <sup>R</sup>	FB1
FB2ΔUAS	<i>a2 b2 ΔP<sub>prf1</sub>(-1509 bp</i> <i>bis -1589 bp)</i>	Nat <sup>R</sup>	FB2
SG200ΔUAS	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> <i>ΔP<sub>prf1</sub>(-1509 bp bis -</i> <i>1589 bp):Nat<sup>R</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> Nat <sup>R</sup>	SG200
SG200ΔUAS- AM1	<i>a1 mfa2 bE1 bW2</i> <i>ΔP<sub>prf1</sub>(-1509 bp bis -</i> <i>1589 bp)</i> <i>ip'[P<sub>um01779</sub>:3eGFP]ip<sup>s</sup></i>	Phleo <sup>R</sup> Nat <sup>R</sup> Cbx <sup>R</sup>	SG200ΔUAS

#### 4.2.4 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Operon Biotechnologie synthetisiert. Die Nukleotidsequenz ist jeweils vom 5'-Ende in Richtung 3'-Ende angegeben.

**Tabelle 6: Oligonukleotide zur Deletion der UAS**

Name	Bezeichnung	Sequenz
oPB14	F1_RV	AGACAGCACATCCTACTACC
oPB15	F1_RV1	TCGAGAGCCAAGTTGGATAG
oPB16	3-UAS NotI	TTGCGGCCGCCAATCCAGACATTAAGCTATTG
oPB17	5-UAS NotI	TTGCGGCCGCACTCGAGTCAGAGTCGAGAGCG
oPB18	F2_RV SfiI	TTCGGCCATCTAGGCCTCTAGGCGTCCGACATCTGC
oPB19	F2_FW SfiI	CACGGCCTGAGTGGCCTGAGTGTACAGGGCGTTGTTG
oPB20	F3_FW	AGATGGACCTGGCTGCTTTC
oPB21	F3_FW1	GAGCTGCTCAAGATTCTC

**Tabelle 7: Zusätzliche Oligonukleotide zur Sequenzierung des *prf1* Promoters**

Name	Bezeichnung	Sequenz
oPB1	M13	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC
oPB2	M13rev	AGCGGATAACAATTTACACAGGA
oPB27	UASseqF	TAACGCTCAGATGCGATG
oPB28	UASseqR	TCGGGTCTCAGATTAGTGTG
oPB35	UASseqF1	CAAGCGAGTAGGTTGAAGG
oPB36	UASseqR1	GGGCTAGGCTGTTGTTATG
oPB46	prfseqRV	GATTTGAGGCGCCTGATCGC
oPB47	prf1seqFW	CGGACGCCTAGAAGAAGTTG
oPB3	NatIL	CCGCTTATCACTTCTAGG
oPB4	NatIR	GACGCGTGACGCATGTAAC

**Tabelle 8: Oligonukleotide für die quantitative Real-Time PCR**für *prf1*

oPB68	Rt-prf1-FW	TCGGTAGAACGAGCTGTGATG
oPB69	RT-prf1-REV	CTGTTGGACGATGTTGGAGTTG

für *ppi*

oPB94	Rt-ppi-F2	ACATCGTCAAGGCTATCG
oPB95	Rt-ppiR2	AAAGAACACCGGACTTGG

#### 4.2.5 Plasmide und Plasmidkonstruktionen

Sämtliche Plasmide tragen eine Ampicillin-Resistenzkassette zur Selektion in *E. coli*. Alle Klonierungsschritte wurden durch Restriktionsanalyse überprüft, alle eingebrachten PCR-Amplifikate wurden sequenziert.

#### 4.2.6 Ausgangsplasmide

##### pCR2.1-TOPO (Invitrogen)

Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten mittels Topoisomerase-Aktivität. Die enthaltenen DNA-Abschnitte können mit *EcoRI* herausgeschnitten werden. Das Plasmid kann für die Blau-Weiß-Selektion verwendet werden. Die Sequenzierung der Inserts ist mittels M13 und M13RV möglich.

#### 4.2.7 Spezielle Vektoren für das Arbeiten in/mit *U. maydis*

##### pUMA262 [BRACHMANN *et al.*, 2004]

Enthält eine Nourseothricin-Resistenzkassette. Das *nat*-Gen wird dabei von dem *hsp70*-Promotor und dem *nos*-Terminator flankiert.

##### pAM1 [MENDOZA-MENDOZA *et al.*, 2009a]

Fusion der Promoterregion von *um01779* mit drei Kopien des *gfp*-Gens, sowie eine Carboxin-Resistenzkassette.

##### paAM1 [MENDOZA-MENDOZA *et al.*, 2009a]

Fusion der Promoterregion von *um01779* mit drei Kopien des *gfp*-Gens in einem autonom replizierenden Plasmid (pNEBUH, A. Brachmann, unveröffentlicht) mit Nourseothricin-Resistenzkassette.

##### p123-otef1-RFP(2X) (U. Fuchs und G. Steinberg, pers. Mitteilung)

Enthält zwei Kopien des *rfp*-Gens unter der Kontrolle des *otef*-Promotors und des *nos*-Terminators, sowie eine Carboxin-Resistenzkassette.

##### p123-otef1-GFP (C. Aichinger, unveröffentlicht)

Enthält das *gfp*-Gen unter der Kontrolle des *otef*-Promotors und des *nos* Terminators, sowie eine Carboxin-Resistenzkassette.

#### 4.2.8 In dieser Arbeit hergestellte Plasmide

##### pCR2.1TOPOF1/F2ΔUAS

Zwei Fragmente F1 (1,15 kb) und F2 (2kb) aus der Promotorregion 5' und 3' der „upstream activating sequence“ (UAS) wurden nach Restriktion mit *NotI* ligiert und das 3,5 kb Ligationsprodukt in PCR2.1-TOPO inseriert. Das Plasmid diente als Zwischenschritt in der Klonierung von pCR2.1TOPOΔUAS.

##### pCR2.1TOPOΔUAS

Das Fragment aus pCR2.1TOPOF1/F2ΔUAS und das Fragment F3 (1kb), das einen Teil des offenen Leserasters von um02712 enthält wurde mit *SfiI* geschnitten und mit der Noursethricin-Resistenzkassette aus pUMA262 ligiert, die zuvor mit *SfiI* geschnitten wurde. Das Ligationsprodukt (5,5 kb) wurde in PCR2.1-TOPO inseriert. Das Konstrukt wurde aus dem Plasmid amplifiziert und diente zur Deletion des UAS-Elements im *prf1*-Promotor.

### 4.3 Mikrobiologische und zellbiologische Methoden

#### 4.3.1 *Escherichia coli*

##### Kultivierung von *E. coli*

*E. coli*-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 37°C kultiviert. Übernachtskulturen wurden von YT-Amp Festmedien angeimpft.

##### RbCl-Transformation von *E. coli*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach Cohen *et al.* (1972). Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen wurden 100 ml dYT-Medium, dem je 10 mM MgCl<sub>2</sub> und MgSO<sub>4</sub> zugesetzt war, mit 1 ml einer frischen TOP10-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> ≈ 0,5 bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren für 15 min bei 3.000 Upm und 4°C (Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert und in 33 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert. Nach 30 - 60 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (15 min, 3.000 Upm, 4°C), der Überstand abgenommen, die Zellen in 5 ml eiskalter RF2-Lösung resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, jeweils 50 µl mit 10 µl Plasmidlösung (1-5 ng Plasmid) versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 90 sec bei 42°C (Eppendorf-Thermomixer) wurde der Transformations-Ansatz mit 800 µl dYT-Medium versetzt und bei 37°C schüttelnd inkubiert (800 Upm, 30 min; Eppendorf-Thermomixer), was zur Expression der β-Lactamase führt. 200 µl der Zellsuspension wurden auf YT-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Auf diese Weise konnte eine Transformationsrate von 10<sup>6</sup> Transformanten pro 1 µg eingesetzter Plasmid-DNA erreicht werden.

**RF1-Lösung:**

- 100 mM RbCl
- 50 mM  $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$
- 30 mM K-Acetat
- 10 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 10 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 15% (v/v) Glycerin
- in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$
- mit Essigsäure auf pH 5,8
- sterilfiltriert

**RF2-Lösung:**

- 10 mM MOPS
- 10 mM RbCl
- 75 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$
- 15% (v/v) Glycerin
- in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$
- mit NaOH auf pH 5,8
- sterilfiltriert

#### **Blau-Weiß-Selektion von *E. coli* Transformanden**

Die korrekte Insertion des Konstruktes in Plasmide, die sich für die Blau-Weiß-Selektion eignen (beispielsweise pCR-TOPO2.1 und II), resultiert in einer Unterbrechung des *lacZ*-Gens, so dass keine funktionelle  $\beta$ -Galactosidase exprimiert wird, die X-Gal in einen blauen Indigofarbstoff spaltet. Kolonien, in denen Plasmide mit Insert enthalten sind, bleiben somit auf X-Gal-haltigen Platten weiß und sind so leicht von den blauen Kolonien mit Vektoren ohne Insertion des gewünschten Konstrukts zu unterscheiden.

#### **4.3.2 *Zea mays***

##### **Isolation von Oberflächenwachsen**

Die Blätter von 1000 sieben Tage alten "Early Golden Bantam" Maispflanzen wurden 1 min mit Chloroform abgewaschen und mit Chloroform auf ein Volumen von 100 ml eingestellt. Im Anschluss wurde der Chloroformextrakt dreimal mit destilliertem Wasser extrahiert und das Chloroform evaporiert. Eine Wachsemulsion (20mg/ml) wurde durch sonifizieren mit einem Sonifier Model 250 (Branson Ultrasonic, Danbury, CT, USA) mit sterilem Wasser gemischt.

##### **Test auf Pathogenität**

Für den Pathogenitätstest wurden 250 - 300  $\mu\text{l}$  einer Pilzsuspension (in Wasser,  $\text{OD}_{600} = 1,0$ ) in das Innere des Blattwirtels von sieben Tage alten Maispflanzen der Sorte Early Golden Bantam gespritzt. Bei kompatiblen Stämmen wurden entsprechende Mischungen (1:1) injiziert. Die Injektionsstelle befindet sich etwa 1 cm über der Erde, also etwa 1,5 bis 3 cm oberhalb des basalen Pflanzenmeristems. Dabei werden in der Regel die Blattscheiden des ersten und des zweiten Blattes und die Blattspreiten des dritten und vierten Blattes durchstoßen. Die Stämme wurden vorher über Nacht in YEPSL-Flüssigkultur zu einer  $\text{OD}_{600} = 0,8 \pm 0,1$  angezogen. Nach Erreichen des optimalen Zelltiters wurden die Zellen durch Zentrifugieren (3.000 Upm, 5 min, 26°C, Heraeus Varifuge 3.0R) geerntet und in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$  zu einer  $\text{OD}_{600} = 1,0$  aufgenommen.

### Quantifizierung der Pathogenität (Bonitur)

6 und 12 Tage nach Infektion wurden die Symptome klassifiziert und quantifiziert; dabei wurde unterschieden zwischen folgenden Kategorien:

- Keine Symptome
- Nur Chlorosen: gelbe Färbung des Blattes
- Ligula Schwellung: Übergang von Blattscheide zur Blattspreite angeschwollen
- leichte Tumore Blatt: kleiner als 2 mm
- Starke Tumore: größer als 2 mm; Tumorbildung am Blatt und/oder Stamm
- Verkrümmt: starke Tumorbildung am Stamm oder der Stammbasis; geht mit Biegung der Wachstumsachse einher
- Tot: tote Pflanzen

### 4.3.3 *Ustilago maydis*

#### Kultivierung von *U. maydis*

*U. maydis*-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28°C kultiviert, sofern nicht anders vermerkt. Übernachtskulturen wurden von Kulturen auf Festmedien, die weniger als einen Monat bei 4°C gelagert wurden, angeimpft. Die bei -80°C gelagerten Glycerinkulturen wurden vor weiteren Arbeiten zunächst auf Festmedien ausgestrichen.

#### Bestimmung der Zelldichte von *U. maydis*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD<sub>600</sub> die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Blindwert wurde die OD<sub>600</sub> des jeweiligen Kulturmediums verwendet. OD<sub>600</sub> = 1,0 entspricht etwa 1-5 x 10<sup>7</sup> Zellen/ml.

#### Induktion des *nar1*-Promotors in AB33

Die Stämme wurden aus Vorkultur in AM-Flüssigmedium angeimpft, das Glucose als einzige Kohlenstoffquelle enthielt, um reprimierende Bedingungen zu gewährleisten, und bis zu OD<sub>600</sub> ≈ 0,6 bei 28°C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin abzentrifugiert (3.500 Upm, 5 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R), der Überstand abgenommen und die Zellen im gleichen Volumen H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> resuspendiert. Nach nochmaliger Pelletierung (3.500 Upm, 5 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R) wurden die Zellen in NM-Flüssigmedium mit 2% YEPSL resuspendiert um den *nar1*-Promotor zu induzieren und in AM-Flüssigmedium mit 2% YEPSL um den Promoter zu reprimieren. Die Kulturen wurden auf Parafilm aufgesprüht und bei 28°C 100% Luftfeuchte für 20 Stunden inkubiert.

#### Induktion des *crg1*-Promotors

Die Stämme wurden aus Vorkultur in CM-Flüssigmedium angeimpft, das Glucose als einzige Kohlenstoffquelle enthielt, um reprimierende Bedingungen zu gewährleisten, und bis zu OD<sub>600</sub> ≈ 0,6 bei 28°C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin abzentrifugiert (3.500 Upm, 5 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R), der Überstand abgenommen und die Zellen im gleichen Volumen H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> resuspendiert. Nach erneuter Pelletierung (3.500 Upm, 5 min, RT, Heraeus Varifuge 3.0R) wurden die Zellen in CM-Flüssigmedium resuspendiert, das Arabinose als einzige

Kohlenstoffquelle enthielt, um den *crg1*-Promotor zu induzieren. Die Kulturen wurden bei 28°C und 200 Upm für die gewünschte Zeit geschüttelt.

### **Filament- und Appressorieninduktion in Flüssigkultur und auf künstlichen Oberflächen**

Übernachtskulturen der jeweiligen Stämme wurden bei 28°C in YEPSL bis zu einer maximalen  $OD_{600} = 0,8$  geschüttelt, pelletiert (3.500 Upm, 5 min, RT; Heraeus Varifuge 3.0R) und in 2 % YEPSL auf eine  $OD_{600}$  von 0.1 eingestellt. Die anschließende Sprühinokulation (EcoSpray Labo Chimie, France) erfolgte auf verschiedene hydrophobe Oberflächen wie Teflonmembran (Hansatech Instruments, Norfolk, UK), Polypropylenfolie (Roth, Germany), Glas-Objektträger (Marienfeld, Germany), Gelbond (Cambrex Bio Science Rockland, Inc, USA) oder Parafilm M (Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA). Die so inokulierten Oberflächen wurden in rechteckigen Petrischalen (Greiner, Germany) mit Wassergetränktem Filterpapier platziert und die Petrischalen mit Parafilm M versiegelt um ein Austrocknen zu verhindern. Die Proben wurden für 16-20 Stunden bei 28°C inkubiert. Um Filamentbildung zu quantifizieren, wurden die Proben mikroskopisch ausgewertet indem die Anzahl der filamentös wachsenden Zellen relativ zu der Gesamtzahl der Zellen bestimmt wurde. Alle Experimente wurden in Triplikat durchgeführt. Um die Bildung von Appressorien zu induzieren, wurden die zu testenden Stämme wie eingangs beschrieben kultiviert und vorbereitet. Vor der Sprühinokulation wurden zu dem Inokulum 12-Hydrostearinsäure bzw. 16-Hydroxypalmitinsäure gegeben und die Proben dann wie oben beschrieben inkubiert. Um die Appressorienbildung zu quantifizieren wurden die Oberflächen vorsichtig mit destilliertem Wasser abgewaschen und mit Calcofluor (Fluorescent Brightener 28, Sigma) Färbelösung (1 µg/ml) gefärbt. Dann wurden die Proben mikroskopisch ausgewertet, wobei die Anzahl der Filamente bestimmt wurde, die eine terminale Verdickung aufwiesen und den Marker exprimierten und im Verhältnis zur Gesamtzahl der Filamente gesetzt.

Um Filamentbildung in Flüssigkultur zu induzieren, wurden die Zellen wie oben beschrieben kultiviert und vorbereitet. Dann wurde 1 ml der Zellsuspension in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und die jeweiligen zu testenden Fettsäuren zugesetzt, wobei Ethanol (1%) als Lösungsmittelkontrolle diente. Die Zellen wurden anschließend in den 2 ml Reaktionsgefäßen auf einem Roll-Inkubator (Snijders) bei ca. 20 Upm in nahezu waagerechter Position gedreht. Nach 20 h wurde die Filamentbildung mikroskopisch analysiert. Die Zellen wurden anschließend in den 2 ml Reaktionsgefäßen auf einem Roll-Inkubator (Snijders) bei ca. 20 Upm in nahezu waagerechter Position gedreht. Nach 20 h wurde die Filamentbildung mikroskopisch analysiert.

### **Pheromonstimulation von SG200 in Flüssigkultur**

Die zu testenden Stämme wurden in YEPSL bei 28°C mit 200 Upm bis zu einer Dichte von  $OD_{600} = 0,5 \pm 0,1$  geschüttelt. Die Zellen wurden 15 ml PPN-Zentrifugenröhrchen (Greiner) pelletiert (3.000 Upm, 5 min, RT; Heraeus Varifuge 3.0R) und der Überstand abgenommen. Danach wurden die Zellen in 2% YEPSL resuspendiert und in 2 ml Reaktionsgefäße aliquotiert. Im Anschluß wurde der Zellsuspension kompatibles Pheromon in DMSO in einer Endkonzentration von 2,5 µg/ml oder nur DMSO (0,1%) zugesetzt. Die Zellen wurden anschließend in den 2 ml Reaktionsgefäßen auf einem Roll-Inkubator (Snijders) bei ca. 20 Upm in nahezu waagerechter Position gedreht. Nach 20 h wurde die Filamentbildung mikroskopisch analysiert.

### Test auf Kreuzungskompetenz

Zellerkennung, Fusion und Dikaryenbildung von *U. maydis* können auf künstlichen Medien beobachtet werden. Dabei erscheinen die dikaryotischen Hyphen, die in regelmäßigen Abständen in ihrem distalen Bereich leere Abschnitte hinterlassen, auf aktivkohlehaltigen Agarplatten als weißes Luftmycel, das sich von den glatten Kolonien haploider Sporidien deutlich unterscheidet [Pulhalla, 1968; Rowell, 1955]. Dazu wurden *U. maydis*-Stämme in YEPSL-Flüssigmedium inokuliert. Bei 28°C wurden die Zellen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-1,0 inkubiert. Die Zellen wurden geerntet (3.500 Upm, 5 min, RT; Heraeus Varifuge 3.0R) und das Pellet anschließend in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> zu einer OD<sub>600</sub> = 1,0 aufgenommen. Von jeder Suspension wurden 5 µl auf eine PD-Charcoal-Platte getropft. Kompatible Stämme wurden kurz zuvor in einer Mikrotiterplatte 1:1 gemischt. Die Aktivkohle-Platten wurden für 24 h (48 h bei Test auf filamentöses Wachstum von SG200-Stämmen) bei 28°C unter Luftabschluss inkubiert. Filamentöses Wachstum wurde anhand der Struktur der Kolonien makroskopisch sichtbar.

### Transformation von *U. maydis*

Dieses Protokoll wurde modifiziert nach Schulz *et al.* (1990) und Gillissen *et al.* (1992). Von einer auf Platte wachsenden Kultur wurde eine 4 ml YEPSL-Flüssigkultur angesetzt und für 8-10 h bei 28°C geschüttelt. Diese Vorkultur wurde anschließend 1:300 in 50 ml frischem YEPSL-Medium verdünnt und bei 28°C bis zu einer maximalen OD<sub>600</sub> = 0,8 geschüttelt. Nach Erreichen des optimalen Zelltiters wurden die Zellen durch Zentrifugieren (3.200 Upm, 10 min, 4°C; Heraeus Varifuge 3.0R) geerntet, einmal mit 25 ml SCS gewaschen und in 2 ml SCS mit 2,5 mg/ml Novozym resuspendiert. Die in diesem Puffer bei RT ablaufende Protoplastierung wurde mikroskopisch verfolgt, da die zigarrenförmigen Zellen nach Lyse der Zellwand eine kugelige Form annehmen. Nachdem etwa 50% der Zellen protoplastiert waren (5-15 min), wurden 10 ml SCS zugegeben und die Protoplasten durch 10 minütige Zentrifugation bei 2.300 Upm (4°C, Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert. Um das Novozym vollständig zu entfernen, wurde dieser Waschgang dreimal wiederholt. Anschließend wurde mit 10 ml STC gewaschen und das Pellet danach in einem Volumen von 0,5 ml eiskaltem STC aufgenommen. Die so behandelten Protoplasten können 3-4 h auf Eis oder aliquotiert bei -80°C mehrere Monate aufbewahrt werden. Zur Transformation wurden 70 µl Protoplasten mit 10-15 µl DNA (1-5 µg) und 1 µl Heparin-Lösung für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml STC/PEG folgte eine weitere Inkubation von 15 min auf Eis. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer kurz zuvor mit Top-Agar überschichteten Regenerationsagarplatte ausgestrichen, die das entsprechende Antibiotikum im Bottom-Agar enthält. Nach 3-6 Tagen Inkubation bei 28°C wurden die gewachsenen Kolonien mit sterilen Zahnstochern auf Antibiotikumhaltigen PD-Platten, vereinzelt. Potentielle Transformanten wurden mittels Southern-Blot Analyse verifiziert.

<b>SCS :</b>	20 mM Na-Citrat, pH 5,8 1 M Sorbitol autoklaviert
<b>STC :</b>	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 100 mM CaCl <sub>2</sub> 1 M Sorbitol autoklaviert
<b>STC/PEG:</b>	15 ml STC 10 g PEG4000

### Glycerinstammhaltung

Zur dauerhaften Aufbewahrung wurden 900 µl einer frischen YEPSL-Übernachtskultur mit 900 µl NSY-Glycerin gemischt und bei -80°C eingefroren.

**NSY-Glycerin-Medium:**            8 g Nutrient Broth  
    5 g Saccharose  
    1 g Hefe-Extrakt  
    696 ml Glycerin  
    in 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>  
    autoklaviert

#### 4.3.4 Mikroskopie und Bildverarbeitung

Die zellmorphologische Betrachtung von *U. maydis* erfolgte an einem Lichtmikroskop (Axiophot, ZEISS) mittels Nomarski-Optik. Für DIC-Mikroskopie und Fluoreszenz-Mikroskopie wurde ein 40-, 63- und 100-faches Plan-Apochromat Objektiv (ZEISS) mit numerischer Apertur 1,4 verwendet. Für die Fluoreszenz-Mikroskopie wurden Filter mit folgendem Anregungs- bzw. Emissionsspektrum eingesetzt: DAPI (Calcofluor-Färbung), 365 nm und >397 nm; eGFP, 450-490 nm und 515-565 nm; RFP 546 nm und >590 nm. Digitale Aufnahmen mit einer hochauflösenden CCD-Kamera (C4742-25, Hamamatsu) wurden als TIFF-Dateien abgespeichert und mit den Programmen MetaMorph (Version 6.2r6) und Adobe Photoshop (Version CS2) bearbeitet (Maßstabs-Kartierung, Bildausschnitt, Kontrast, Helligkeit). Für die konfokale Mikroskopie wurde das Mikroskop TCS-SP5 (Leica Microsystems) verwendet. Für eGFP erfolgte die Anregung mittels Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 458 nm. Die Emission wurde für eGFP im Bereich von 500-540 nm gemessen. Zur Visualisierung von Calcofluor gefärbten Zellen erfolgte die Anregung mit 405 nm und die Detektion bei 415–460 nm. Für RFP erfolgte die Anregung bei 561 nm und die Detektion bei 580-630 nm. Die Auswertung und Bearbeitung der Bilddaten erfolgte über die Software LAS (Leica Application Suite).

#### 4.3.5 Bestimmung des Kontaktwinkels von Oberflächen

Es wurden 10 µl Tropfen einer 0,01% Coomassie-Lösung auf die zu testenden Oberflächen aufgebracht und die Tropfen getrocknet. Dann wurden die Durchmesser der eingetrockneten Tropfen gemessen und der Kontaktwinkel mit den entsprechenden mathematischen Formeln bestimmt [DOEHLEMAN *et al.*, 2006].



## 4.4 Molekularbiologische Standard-Methoden

Standardtechniken, wie beispielsweise Aufreinigung, Fällung und elektrophoretische Auftrennung von DNA, oder Klonierungstechniken sind bei Ausubel *et al.* (1987) Sambrook *et al.* (1989) ausführlicher beschrieben. Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht OD<sub>260</sub> = 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 33 µg/ml einzelsträngiger DNA, bzw. 40 µg/ml RNA. Als Maß für die Reinheit der Desoxyribonukleinsäuren diente der Quotient aus A<sub>260</sub> zu A<sub>280</sub>. Für reine DNA und RNA sollte er bei etwa 1,8 liegen. Niedrigere Werte weisen auf Verunreinigungen mit Proteinen hin, höhere Werte auf Verunreinigungen mit Salzen oder Zuckern. Die Messungen erfolgten in einem NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop-Technologies).

### 4.4.1 Isolierung von Nukleinsäuren

#### Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung erfolgte durch "Lyse durch Kochen" nach Sambrook *et al.* (1989). 1,5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur wurden pelletiert (13.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge 15). Das Zellpellet wurde in 300 µl STET resuspendiert, nach Zugabe von 20 µl Lysozym-Lösung (10 mg/ml) kräftig geschüttelt und anschliessend 40 sec bei 95°C in einem Eppendorf-Heizblock inkubiert. Die lysierten Zellen und die denaturierte genomische DNA wurden 15 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert (Heraeus Biofuge 15) und danach mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Lösung entfernt. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgt durch Fällung mit 40 µl 3 M Na-Acetat, pH 5,3 und 400 µl Isopropanol bei RT für 5 min und anschliessender Zentrifugation für 5 min bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge 15). Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und nach Trocknen in 200 µl TE-Puffer mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen. Mit dieser Methode gelang es routinemässig, aus 1,5 ml Übernachtskultur etwa 50 µg Plasmid-DNA zu isolieren.

**STET:** 50 mM Tris-HCl, pH 8,0  
50 mM Na<sub>2</sub>-EDTA  
8% (w/v) Saccharose  
5% (v/v) Triton X-100  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

**Lysozym-Lösung:** 10 mg/ml Lysozym  
10 mM Tris-HCl, pH 8,0  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

#### DNA-Isolierung aus *U. maydis*

Diese Methode ist modifiziert nach Hoffman und Winston, (1987). Dabei wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur in YEPSL-Flüssigmedium zusammen mit 0,3 g Glasperlen in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäss pelletiert (13.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge 15), der Überstand abgegossen und das Pellet in 400 µl *Ustilago*-Lysispuffer und 400 µl TE-Phenol/Chloroform aufgenommen. Die Proben wurden für 10 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA) geschüttelt. Nach

Phasentrennung (13.000 Upm, 5 min, RT, Heraeus Biofuge 15) wurden 400 µl des Überstands in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 1 ml Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (13.000 Upm, 30 sec, RT, Heraeus Biofuge 15) wurde das Pellet in 50 µl TE mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen, bei 50°C resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

**Ustilago-Lysispuffer:** 50 mM Tris-Cl, pH 7,5

50 mM Na<sub>2</sub>-EDTA

1% (w/v) SDS

in H<sub>2</sub>O bid.

#### **TE-Phenol/Chloroform:**

Mischung aus gleichen Teilen Phenol (mit TE-Puffer äquilibriert) und Chloroform

#### **RNA-Isolierung nach Aquaphenol-Methode**

Diese Methode wurde zur Präparation von Gesamt-RNA aus Pilzkulturen, die in Flüssigmedium **(A)** oder auf künstlichen Oberflächen **(B)** gewachsen waren, verwendet: **(A)** Isolierung von Gesamt-RNA aus Pilzkulturen die in Flüssigmedium gewachsen waren: Auf das tiefgefrorene Zellpellet, wurden 0,5 ml Aqua-Phenol und 0,5 ml AE-Puffer mit 1% SDS pipettiert, dieser Ansatz kurz gevortext und nach Zugabe von ca. 0,3 g Glasperlen (0,35-0,45 µm; Sigma) anschliessend für 5 min auf einer Retsch-Kugelmühle bei 30 Hz aufgeschlossen, bzw. homogenisiert. Anschliessend wurde die Probe für 10 min bei 60°C in einem Eppendorf Thermomixer unter Schütteln (800rpm) inkubiert, bevor sie für weitere 10 min bei -80°C inkubiert wurde. Nach Zentrifugation (13.000 Upm, 4°C, 15 min, Heraeus Biofuge stratos) wurde die wässrige Phase abgenommen, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 500 µl Aqua-Phenol/Chloroform weitere 15 min zentrifugiert (13.000 Upm, 4°C, 15 min, Heraeus Biofuge stratos). Wieder wurde die wässrige Phase (ca. 400 µl) abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 1 ml Ethanol sowie 40 µl 3M Na-Acetat zugegeben und das Reaktionsgefäß einige Male invertiert (3-5). Nach einer erneuten Zentrifugation (22.000 Upm, 4°C, 30-60 min, Heraeus Biofuge stratos) wurde die pelletierte RNA mit 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (22.000 Upm, 4°C, 10 min, Heraeus Biofuge stratos). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für 5 min bei RT getrocknet, anschliessend in 30 µl Rnase-freien- H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei 55°C resuspendiert. Im Anschluß wurde die Probe mit dem Turbo-DNAfree Kit (Ambion) nach Protokoll behandelt und mit dem Qiagen RNAeasy Kit nach Herstellerprotokoll aufgereinigt und in 30 µl eluiert. Eine Quantitäts- und Qualitätskontrolle erfolgte durch photometrische Messung am NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, sowie eine Analyse auf einem Agilent 2100-BioanalyzerR. Details zum Agilent 2100-BioanalyzerR siehe Herstellerangaben bzw. Herstellerprotokoll.

**(B)** Isolierung von Gesamt-RNA aus Pilzkulturen, die auf künstlichen Oberflächen gewachsen waren, erfolgte, indem die Zellen mittels eines Zellschabers (GreinerBioOne) von der Oberfläche entfernt und mittels Zentrifugation (13.000 Upm, 20°C, Heraeus Biofuge pico) pelletiert wurden. Im Anschluß wurden 500 µl Aqua-Phenol auf die Oberfläche gegeben und die verbleibenden Zellen mittels des Zellschabers von der Oberfläche gekratzt. Die in Aqua-Phenol resuspendierten Zellen wurden zu den bereits pelletierten Zellen gegeben. Danach wurden 500 µl AE-Puffer mit 1% SDS zugegeben und gevortext. Danach wurde wie unter **(A)** beschrieben mit der RNA-Präparation fortgefahren.

**10X AE-Puffer**

**AE-Puffer:Lösung I** 500 mM Na-Acetat  
100 mM Na<sub>2</sub>-EDTA\*2H<sub>2</sub>O

**AE-Puffer:Lösung II** 500mM Essigsäure 99,7%  
100 mM Na<sub>2</sub>-EDTA\*2H<sub>2</sub>O

Lösung I in einem ausreichend großen Gefäß vorlegen und so lange Lösung II zugeben, bis pH 5,3 erreicht ist (ca. 150ml Lösung II pro Liter Lösung I).

**4.4.2 In vitro Modifikation von Nukleinsäuren****Restriktionen**

Restriktionen von DNA wurden mittels Typ II-Restriktionsendonukleasen (NEB, Frankfurt) für 1-12 h bei Enzym-spezifischer Temperatur durchgeführt. Die restringierte DNA wurde später auf Agarosegelen analysiert. Ein typischer Restriktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

0,5–2 µg reine DNA  
2 µl enzyspezifischer 10 x NEB-Puffer 1-4  
ggf. 2 µl 10x BSA  
0,5 U Restriktionsendonuklease  
ad 20 µl mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

**Ligation von DNA-Fragmenten**

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde T4-DNA-Ligase (Roche, Mannheim) eingesetzt. In Ligationen, bei denen ein linearisierter Vektor mit einem Insert verbunden werden sollte, wurde die entsprechende DNA im molaren Verhältnis von 1:5 eingesetzt. In Ligationen, bei denen zwei Flanken mit einer Restriktionskassette (für *U. maydis* Deletionskonstrukte) gekoppelt werden sollten, wurden die Flankenfragmente in einem molaren Verhältnis von 2:1 gegenüber der Resistenzkassetten-DNA eingesetzt. Die Ligationen wurden für mindestens eine halbe Stunde (RT) oder über Nacht (16°C) durchgeführt. Ein typischer Ligationsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

n mol Vektor oder Resistenzkassetten-DNA  
5 x n mol bzw 2 x n mol Insert oder Flanken-DNA  
2 µl 10x T4-DNA-Ligase-Puffer  
400 U T4-DNA-Ligase  
ad 20 µl mit H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

**Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren**

Mittels Gelelektrophorese wurden Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld größenspezifisch aufgetrennt. Die Agarosekonzentration der verwendeten Gele variierte zwischen 0,8% und 2,0%. Zur Herstellung der Gele wurde die jeweilige Menge an Agarose in 1x TAE oder 0,5x TBE durch aufkochen gelöst und anschließend (nach Erkaltung auf ca. 60°C) mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,25 µg/ml) versetzt. Das Gel wurde nun in flüssigem Zustand in eine Gelform gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde dies in eine dafür vorgesehene

Gelkammer transferiert und mit dem Puffer, mit dem auch das Gel angesetzt wurde, bedeckt. Das Gel wurde nun auf der Seite der Kathode mit DNA oder RNA in nicht denaturierendem Gelauftragspuffer beladen und bei ca. 5-10 V/cm einem elektrischen Feld ausgesetzt. Hierbei wanderte die DNA als poly-Anion langsam (in Abhängigkeit von Grösse und Agarosekonzentration) in Richtung Anode. Sichtbar gemacht wurde die DNA durch UV-Bestrahlung bei 254 nm. Die Dokumentation fand mit der Geldokumentationsanlage (BioDoc-IT-System, UVP) statt.

5x TBE-Puffer	440 mM Tris-Base 440 mM Borsäure 10 mM EDTA, pH 8,0
50x TAE-Puffer	2 M Tris-Base 2 M Essigsäure 50 mM EDTA pH 8,0
6x Gelauftragspuffer (nicht-denaturierend)	50% (v/v) Sucrose 0,1% (v/v) Bromphenolblau mit TE-Puffer-Wasser ansetzen und sterilfiltrieren

### Extraktion und Aufreinigung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren (z. B. PCR- oder Restriktionsansätze) wurden mit dem Kit „Wizard SV Gel and PCR Purification System“ (Promega, Mannheim) aus Agarosegelfragmenten nach Herstellerangaben eluiert bzw. aufgereinigt.

### Auftrennung und Nachweis von DNA (Southern Blot)

Diese Methode ist modifiziert nach Southern (1975). Der Transfer der aufgetrennten DNA Fragmente aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgte durch Kapillar-Blot. Hierbei wird die Transfer-Lösung (0,4 M NaOH) aus einem Pufferreservoir über Kapillarkräfte durch das Gel hindurch in einen auf dem Gel platzierten Stapel Papierhandtücher gesaugt. Die DNA Fragmente werden durch den Pufferstrom aus dem Gel eluiert und binden an die darüberliegende Nylonmembran (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech). Vor dem Transfer wurde das Agarosegel für 15 min in 0,25 M HCl inkubiert, um einen Teil der Purine abzuspalten, damit ein Transfer grosser DNA-Fragmente erleichtert wird. Anschliessend wurde das Gel für 15 min in 0,4 M NaOH inkubiert. Der Kapillar-Blot erfolgte in der Regel über Nacht, mindestens aber für 4 Stunden.

### Spezifischer Nachweis immobilisierter DNA über radioaktive Markierung

Zur Markierung von DNA mit  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dCTP (Hartmann Analytic) wurden 200-500 ng PCR-Produkt oder Restriktions-Fragment mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid}}$  auf ein Volumen von 33  $\mu\text{l}$  aufgefüllt, 10 min bei 98°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Dieser Ansatz wurde mit 5  $\mu\text{l}$  10x Labeling Puffer (NEB), 6  $\mu\text{l}$  dNTP Mix ohne dCTP (0,5 mM 1:1:1), 1  $\mu\text{l}$  Klenow-Enzym (NEB) und 5  $\mu\text{l}$   $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dCTP (1,85 MBq) auf 50  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reinigung von nicht inkorporierten radioaktiven dCTPs erfolgte über Amersham S300 Säulchen (2800 Upm, 2 min; Heraeus Biofuge 15), die zuvor durch Vortexen und Zentrifugation (2.700 Upm, 1 min) äquilibriert wurden. Die markierte Sonde wurde in 10 ml Hybridisierungspuffer aufgenommen und 10 min bei 98°C denaturiert. Die Membranen wurden 10 min mit Southern-Hybridisierungspuffer prähybridisiert (65°C) und der Prähybridisierungspuffer anschliessend durch die denaturierte Sonde ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C über Nacht drehend

im Hybridisierungssofen. Die strahlungssensitiven Filter für den Phosphorimager (Storm 840; Molecular Dynamics) wurden mit den Membranen exponiert und eingelesen. Die weitere Bearbeitung erfolgte über die Software Imagequant (Molecular Dynamics).

**Hybridisierungspuffer:** 50 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,0  
 50 mM PIPES  
 100 mM NaCl  
 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA  
 5% (w/v) SDS  
 in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

**Waschpuffer:** 1x SSC  
 0,1% (w/v) SDS  
 in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

#### 4.4.3 Biochemische Methoden

##### SDS-Gelelektrophorese

Es wurde die Methode der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) angewendet (Laemmli, 1970). Zum Denaturieren wurden 17 µl ESB-Proteinlösung mit 3 µl β-Mercaptoethanol gemischt und erhitzt (5 min, 99°C), was die vollständige Sättigung der Proteine mit Natriumdodecylsulfat (SDS) ermöglicht. Für die Auftrennung (25 mA, 1 h) wurde eine Mini Protean II Apparatur (Biorad) verwendet und als Größenmarker prestained-PageRuler (Fermentas) eingesetzt.

**Trenngel:** 375 mM Tris-HCl, pH 8,8  
 10% (w/v) Acrylamid  
 0,27% (w/v) Bisacrylamid  
 0,1% (w/v) SDS  
 zum Starten der Polymerisation:  
 0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat  
 0,1% (w/v) TEMED

**Sammelgel:** 125 mM Tris-HCl, pH 6,8  
 5% (w/v) Acrylamid  
 0,13% (w/v) Bisacrylamid  
 0,1% (w/v) SDS  
 zum Starten der Polymerisation:  
 0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat  
 0,1% (w/v) TEMED

**SDS-Laufpuffer:** 25 mM Tris-HCl, pH 8,8  
 200 mM Glycin  
 0,1% (w/v) SDS

## Western-Analyse

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden mittels eines Semi-dry Elektro-Blots (UniEquip) in einem dreistufigen Puffersystem auf eine Nitrozellulose-Membran (Immobilon-P; Millipore) transferiert. Dabei wurde das Gel zunächst für 10 min in Kathodenpuffer äquilibriert und die Membran für 10 sec in Methanol aktiviert, mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bid.}}$  gewaschen und mit Anodenpuffer 2 äquilibriert. Der Blot wurde folgendermaßen von unten nach oben aufgebaut: Kathode, 3x Whatman-Papier (getränkt in Kathodenpuffer), Polyacrylamidgel, Nitrozellulose-Membran, Whatman-Papier (getränkt in Anodenpuffer 2), 2x Whatman-Papier (getränkt in Anodenpuffer 1), Anode. Durch Anlegen der Spannung (1 h, 1 mA/cm<sup>2</sup>) wurden die Proteine auf die Membran transferiert.

Anodenpuffer 1	300 mM Tris-HCl, pH 10,4 15% (v/v) Methanol
----------------	--

Anodenpuffer 2	30 mM Tris-HCl, pH 10,4 15% (v/v) Methanol
----------------	---

Kathodenpuffer	25 mM Tris-HCl, pH 9,4 40 mM Aminocapronsäure 15% (v/v) Methanol
----------------	--

Die mit Proteinen beladene Nitrozellulose-Membran wurde mit 5% BSA (in TBST) für 1 h geblockt und mit TBST gewaschen (2x 10 min). Der primäre Antikörper wurde in TBST (5% BSA) nach Herstellerangaben verdünnt und mit der Membran 2 h bei 4°C schwenkend inkubiert. Nach Waschen mit TBST (3x 10 min) wurde der sekundäre Antikörper, ein Anti-Maus HRP (Horseradish-Peroxidase)-Konjugat (Promega), in einer Verdünnung von 1:5.000 (TBST, 3% Magermilchpulver) zu der Membran gegeben und über Nacht bei 4°C langsam geschwenkt. Abschließend wurde die Membran erneut mit TBST gewaschen (3x 10 min). Zur Detektion der Peroxidase-Aktivität wurden die beiden Lösungen ECL I und ECL II zu gleichen Teilen gemischt und auf der Membran verteilt. In Plastikfolie eingeschweißt, wurde mit der Membran ein Röntgenfilm (Kodak X-Omaz XAR-5) 5–20 sec exponiert; dieser wurde anschließend entwickelt (QX-60, Konica).

TBST	20 mM Tris-HCl, pH 7,6 136 mM NaCl 0,05% (v/v) Tween20
------	--

ECL I	100 mM Tris-HCl, pH 8,0 0,44% (v/v) p-Coumarinsäure in DMSO 1% (v/v) Luminol in DMSO
-------	--

ECL II	100 mM Tris-HCl, pH 8,0 0,018% (v/v) $\text{H}_2\text{O}_2$
--------	--

#### 4.4.4 Sequenz- und Strukturanalyse

##### Sequenzierung von DNA

DNA wurde mit einem ABI 377 Sequenzierautomat von Perkin Elmer sequenziert. Vor der automatischen Sequenzierung wurde die DNA mit dem JETquick-Kit (Genomed) aufgereinigt. Die Sequenzreaktion wurde mit 35 Zyklen und unter Verwendung des BigDye-Kits nach Angabe des Herstellers (ABI) durchgeführt. Das Prinzip entspricht der Didesoxy-Methode nach (Sanger *et al.*, 1992). In den Reaktionsansatz werden ddNTPs gegeben, durch deren Einbau ein Kettenabbruch erfolgt. Die verschiedenen Basen sind mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert. Nach der Sequenzreaktion wurde die DNA gefällt. Das getrocknete Pellet wurde in 4 µl Formamid mit 25 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, pH 8,0 aufgenommen und 5 min bei 95°C aufgeköcht. Ein 1,5 µl Aliquot wurde anschliessend auf das Gel aufgetragen. Die Banden wurden nach der Auftrennung in einem Sequenzgel und Anregung durch einen Laser von einer Photozelle detektiert. Die erhaltenen Daten wurden mit den Programmen Chromas und CloneManager ausgewertet.

##### Sequenz- und Strukturanalyse

**Chromas 1.45** (Technolysium Pty Ltd) zur Bearbeitung von DNA-Sequenz-Rohdaten.

**BLAST2** (Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997; Gish und States, 1993) zur Identifizierung ähnlicher Proteine oder DNA-Sequenzen in den öffentlichen Datenbanken.

**SMART** (Schultz *et al.*, 1998) zur Identifizierung konservierter Domänen in Proteinen, bzw. zur Identifizierung von Proteinen mit ähnlichen Domänen oder ähnlicher Domänenstruktur.

**PFAM** (Sonnhammer *et al.*, 1997) zur Vorhersage konservierter Proteindomänen bzw. zur Identifizierung von Proteinen mit ähnlichen Domänen oder ähnlicher Domänenstruktur.

**CLUSTALW** (Eddy, 1995) und **CLUSTALX** (Heringa, 1999) zum Vergleich mehrerer Protein oder DNA-Sequenzen.

**CLONEMANAGER** (Version 8; Sci EdCentral) zur Erstellung und Bearbeitung von Plasmid- und genomischen Sequenzen, zum erstellen von Primern und zeichnen von genetischen Karten.

#### 4.4.5 PCR-Techniken

##### Standard-PCR-Ansätze

Die Methode ist modifiziert nach Innis *et al.* (1990). Ein typischer PCR-Ansatz enthielt etwa 10 ng Template-DNA, die beiden Oligonukleotide in einer Endkonzentration von 1 µM, dNTPs in einer Endkonzentration von 200 µM (d. h. je 200 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) in PCRPuffer. Standardmäßig wurden die Reaktionen in einem Volumen von 50 µl durchgeführt. Bei Verwendung der aufgeführten Oligonukleotide und einer Amplifikatlänge von unter 1 kb sah ein typisches Protokoll folgendermaßen aus: Denaturierung bei 94°C für 2 min, Zugabe von 1-2 U Taq DNA-Polymerase, Denaturierung bei 94°C für 1 min, 30 Zyklen mit jeweils 30 sec Denaturierung bei 94°C, 1 min Annealing bei 65°C und 1,5 min Elongation bei 72°C, mit einer abschließenden Elongationsphase von 5 min bei 72°C. Bei Benutzung anderer Oligonukleotide oder der Herstellung längerer

Amplifikate musste die Hybridisierungstemperatur bzw. Elongationszeit entsprechend angepasst werden. Die Reaktionen erfolgten im Thermocycler (PTC 100 oder PTC 200, MJ Research).

PCR-Ansätze mit der Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase erfolgten nach Angaben des Herstellerprotokolls.

### **DNaseI-Behandlung und Reverse Transkription (für Real-Time-PCR)**

Für die reverse Transkription wurde zunächst die isolierte Gesamt-RNA mit der Turbo DNase I (Ambion) behandelt, um eventuell noch vorhandene DNA-Kontaminationen zu entfernen. Hierbei wurde nach Herstellerprotokoll vorgegangen (Einzelheiten siehe Herstellerprotokoll TURBO DNA-free™-Kit). Für die Reverse Transkription wurde das SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix- Kit von der Firma Invitrogen nach Herstellerprotokoll verwendet. Für die reverse Transkription von Gesamt-RNA, die aus Pilzkulturen und Tumormaterial extrahiert wurde, wurden 0,5-1 µg DNase-behandelter RNA eingesetzt und zusammen mit Oligo(dT)20-Primern, den entsprechenden Puffern und Enzymgemischen (Details, siehe Herstellerprotokoll) für die Erststrang-cDNASynthese bei 50°C für 50 min inkubiert. Die synthetisierte cDNA wurde mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O 1:5 verdünnt und bei -20°C gelagert. Für Gesamt- RNA, die aus Pilzmaterial von der Pflanzenoberfläche isoliert wurde, wurden 10-50 ng Gesamt-RNA eingesetzt und bei 50°C für 50 min inkubiert. Die synthetisierte cDNA wurde 1:10 verdünnt eingesetzt.

### **Real-Time-PCR**

Real-time PCR wurden mit Hilfe des Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG-Kit der Firma Invitrogen nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die PCR Reaktion wurden 5 µl der synthetisierten cDNA eingesetzt (s.o.). Als Referenzfarbstoff wurde Fluorescein (1 µl einer 1 µM Stammlösung/ 50 µl Reaktionsansatz) der Firma Biorad eingesetzt. Die Reaktionen erfolgten auf einem Bio-Rad-iCycler-System unter der Verwendung des folgenden Programms: 95°C für 2 min, 45 Zyklen für 30 s bei 95°C, 30 s bei 62°C und 30 s bei 72°C. Im Anschluß hieran wurde die Spezifität der Amplifikation anhand einer Schmelzkurve am Bio- Rad-iCycler-System überprüft. Zur Kalkulation des des CT-Wertes (Threshold Cycle), der den Wert bzw. Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz zum ersten Mal signifikant über die Hintergrundfluoreszenz steigt, wurde die BioRad-Software Version 3.0a verwendet. Die Berechnung der relativen Expressionswerte erfolgte mit dem Program Bio-Rad Gene Expression Macro der Firma Biorad. Hierbei diente das konstitutiv exprimierte Gen *ppi* (*peptidylprolyl isomerase*) als Kontrolle.

## **4.4.6 Transkriptom-Analyse**

### **Wachstumsbedingungen**

Die Zellen vom Stamm SG200AM1 wurden in YEPSL bei 28°C auf einem Schüttler bei 200 Upm bis zum Erreichen einer Dichte von OD<sub>600</sub> = 0,6 +/- 0,1 geschüttelt. Die Zellen wurden in 15 ml PPN-Zentrifugenröhrchen (Greiner) pelletiert (3.000 Upm, 5 min, RT; Heraeus Varifuge 3.0R) und der Überstand abgenommen. Danach wurden die Zellen in 2% YEPSL resuspendiert und auf OD<sub>600</sub>=1 eingestellt. Dann wurden je 1,98 ml der Zellsuspension in 2 ml Reaktionsgefäße aliquotiert. Den Zellen wurde im Anschluß 16-Hydroxypalmitinsäure in Ethanol in einer Endkonzentration von 100µM oder nur Ethanol (Endkonzentration 1%) zugesetzt. Die Zellen wurden anschließend

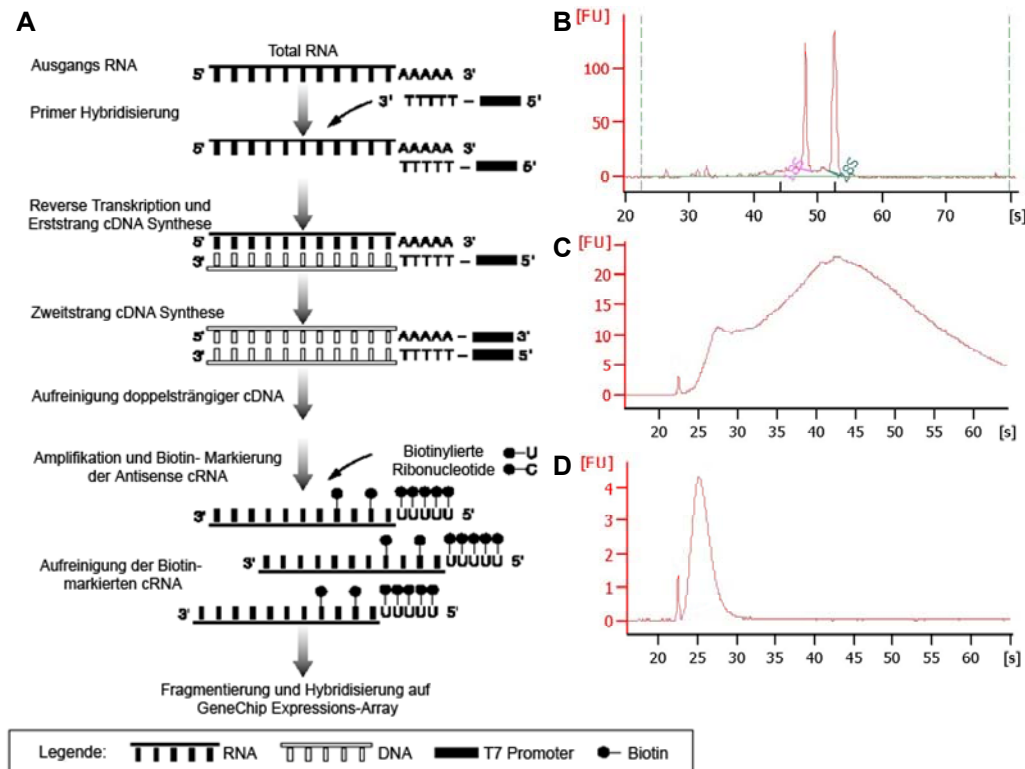


## RNA-Isolierung

Siehe Kapitel 4.6.1

### Übersicht über die Probenvorbereitung für die Transkriptomanalyse

Die Quantität der Isolierten RNA wurde nach DNase Verdau und Aufreinigung mittels eines NanoDrop ND-1000 bestimmt. Die Ausbeute lag hierbei zwischen 6 und 18 µg pro Ansatz. Es wurden 2 µg Gesamt-RNA für die Affymetrix-Array Analyse verwendet, nachdem zuvor die Qualität der RNA mittels Kapillargelelektrophorese auf einem Agilent Bioanalyser 2100 bestimmt wurde (Abb. 40 B). Die einzelnen Schritte der Probenvorbereitung für die Transkriptionsanalyse sind in Abb. 40 A schematisch dargestellt.



**Abbildung 40: Schematische Darstellung der Probenvorbereitung für die Transkriptionsanalyse.**

**A.** Ausgehend von der isolierten Gesamt-RNA wurde zunächst eine reverse Transkription mit T7-Oligo(dT)-Oligonukleotiden durchgeführt, um den cDNA Erststrang zu erzeugen. Hieran schloss sich eine Zweitstrang-cDNASynthese mit T7-Oligo(dT)-Oligonukleotiden an. Darauf folgte die *in vitro*-Transkription unter gleichzeitiger Markierung der Hybridisierungs-Sonden mit biotinylierten Ribonukleotiden. Die Qualität der isolierten Gesamt-RNA, sowie einzelne Schritte der Zwei-Schritt-Amplifikation mittels Kapillargelelektrophorese auf einem Agilent Bioanalyser 2100 bestimmt (**B-D**). **B.** Die Qualität der Gesamt-RNA wurde anhand der Integrität der ribosomalen Banden überprüft. **C.** Gezeigt ist die amplifizierte cRNA nach der *in vitro*-Transkription. Die Transkripte hatten eine durchschnittliche Länge von ca. 1400-1600 bp. **D.** Vor der Hybridisierung des DNA-Microarrays wurden die biotinylierten cRNA-Transkripte auf eine durchschnittliche Größe von ca. 30-200 bp fragmentiert.

Ausgehend von der Gesamt-RNA erfolgte die Hybridisierung der T7-Oligo(dT)-Oligonukleotide. Nach diesem Schritt erfolgte die reverse Transkription mit Erststrang-Synthese, gefolgt von der Zweitstrang-Synthese. Die so erhaltene

doppelsträngige (ds)-cDNA wurde aufgereinigt, die Quantität mit dem NanoDrop bestimmt und diente als Template für die *in vitro*- Transkription. In dieser Reaktion wurde die ds-cDNA zu cRNA umgeschrieben und gleichzeitig mit biotinylierten Ribonukleotiden markiert. Nach der Aufreinigung der cRNA mit einer durchschnittlichen Transkriptlänge von 1400-1600 bp (Abb 40. C) wurde die cRNA fragmentiert. Die so erhaltenen Sonden von 30- 200 bp (Abb. 40. D) wurden auf den *U. maydis*- Microarray Chip hybridisiert.

### **RNA-Aufreinigung nach RNeasy-Protokoll**

100 µl gelöste RNA wurde mit 350 µl Puffer RLT und 250 µl 100% EtOH gemischt. Dieser Ansatz wurde auf eine RNeasy-Säule pipettiert und für 15 sek bei 10.000 Upm, RT zentrifugiert. Nach Zugabe von 500 µl Puffer RPE wurde die Säule erneut für 15 sek bei 10.000 Upm, RT zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt bei 2 min, 10.000 Upm. Anschließend wurde die Säule erneut zentrifugiert, um die Matrix vollständig zu trocknen. Zur Elution der RNA wurden 30 µl RNase-freies Wasser (Ambion) auf die Matrix pipettiert und die Säule für 1 min bei 10.000 Upm zentrifugiert. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Qiagen; die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Protokoll hervor.

### **cDNA-Synthese mittels Ein-Schritt-Amplifikation nach dem Affymetrix-Protokoll**

Alle nachfolgenden Schritte der Ein-Schritt-Amplifikation sind im „GeneChip® Expression Analysis Technical Manual“ der Firma Affymetrix näher beschrieben. Soweit nicht anders angegeben, wurde nach Herstellerprotokoll vorgegangen.

Zur Synthese eines cDNA-Erststranges wurden 2 µg gereinigte RNA (nach photometrischer Konzentrationsbestimmung) mit Nuklease freiem Wasser (Ambion) auf ein Volumen von 9 µl eingestellt und 2 µl 50 µM T7(dT)- Primer in einem Volumen von 11 µl für 10 min bei 70°C inkubiert. Nach Abzentrifugieren wurde der Ansatz auf Eis gestellt, mit 4 µl 5x Erststrangpuffer, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl 10 mM dNTP-Mix versetzt und für 2 min bei 42°C inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl SuperScript II RT wurde die Mischung für 1 h bei 50°C inkubiert. Zur Zweitstrangsynthese wurde der oben beschriebene Ansatz mit 91 µl H<sub>2</sub>O, 30 µl 5x Zweitstrangpuffer, 3 µl 10 mM dNTP-Mix, 1 µl *E. coli*- DNA-Ligase (10 U/ml), 4 µl *E. coli*-DNA Polymerase I und 1 µl *E. coli*-RNaseH versetzt und für 2 h bei 16°C inkubiert. Anschliessend wurden 2 µl T4-DNA-Polymerase zugegeben, der Ansatz für weitere 5 min bei 16°C inkubiert und die Reaktion mit 10 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Diese Methode orientiert sich an den Protokollen der Firmen Affymetrix und Invitrogen; die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem jeweiligen Protokoll hervor.

### **cDNA-Aufreinigung**

600 µl cDNA-Bindepuffer wurden zu 162 µl cDNA gegeben, der Ansatz kurz gevortext und auf eine cDNA-Reinigungssäule aufgetragen. Nach Zentrifugation für 1 min bei 10.000 Upm, RT wurde die Säule mit 750 µl cDNA-Waschpuffer gewaschen und erneut für 1 min bei 10.000 Upm, RT zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses wurde die Säule mit geöffneten Verschlusskappen für 5 min bei 13.000 Upm, RT zentrifugiert. Die Elution der cDNA erfolgte mit 14 µl cDNA-Elutionspuffer und einminütiger Zentrifugation bei 13.000 Upm, RT. Eine Qualitätskontrolle der cDNA erfolgte auf einem Agilent 2100-Bioanalyzer. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firmen Affymetrix und Qiagen; die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus den Protokollen hervor.

### **cRNA-Synthese – *in vitro*-Transkription**

Die *in vitro*-Transkription erfolgte mit dem GeneChip IVT Labeling Kit. Dabei wurde die Gesamtmenge der verfügbaren cDNA (12 µl) mit Nuklease freiem Wasser auf ein Volumen von 20 µl gebracht und mit 4 µl 10x IVT Labeling Puffer, 12 µl IVT-Labeling NTP Mix und 4 µl IVT Labeling Enzyme Mix in einem Gesamtvolumen von 40 µl versetzt. Die Komponenten wurden kurz gevortext, abzentrifugiert und anschließend bei 37°C für 16 h inkubiert. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Affymetrix; die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Protokoll hervor.

### **cRNA-Aufreinigung**

60 µl H<sub>2</sub>O wurden zum Gesamtvolumen der *in vitro*-Transkriptions-Reaktion pipettiert und für 3 sek gevortext. Der Ansatz wurde mit 350 µl IVT cRNA-Bindepuffer versetzt und erneut für 3 sek gevortext. Anschließend wurden 250 µl 100% EtOH zugegeben und die Lösung durch Pipettieren gemischt. Dieser Ansatz wurde auf IVT-cRNASäulen aufgetragen und für 15 sek bei 10.000 Upm, RT zentrifugiert. Nach Zugabe von 500 µl IVTcRNA- Waschpuffer wurden die Säulen erneut für 15 sek bei 10.000 Upm, RT zentrifugiert. Es wurden dann 500 µl 80% EtOH zugegeben und die Säule erneut für 15 sek bei 10.000 Upm, RT zentrifugiert. Nach Verwerfen des Eluates wurde die Säule für 5 min bei 13.000 Upm, RT zentrifugiert. Zur Elution der cRNA wurden 11 µl H<sub>2</sub>O auf die Matrix pipettiert, die Säule für 1 min bei RT inkubiert, für 1 min bei 13.000 Upm, RT zentrifugiert, erneut mit 10 µl H<sub>2</sub>O versetzt, für 1 min bei RT inkubiert und für 1 min bei 13.000 Upm, RT zentrifugiert. Eine Qualitätskontrolle der cRNA erfolgte auf einem Agilent 2100- Bioanalyser und durch photometrische Messung. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Qiagen; die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Protokoll hervor.

### **cRNA-Fragmentierung**

20 µg cRNA wurden für eine cRNA Fragmentierungsreaktion eingesetzt, die sich am Protokoll der Firma Affymetrix orientiert. 20 µg cRNA wurden dafür mit 8 µl Mg<sup>2+</sup>-haltigem 5x Fragmentations-Puffer und H<sub>2</sub>O in einem Gesamtvolumen von 40 µl gemischt. Dieser Ansatz wurde 35 min bei 94°C inkubiert und anschließend auf Eis gehalten. Eine Qualitätskontrolle der fragmentierten cRNA erfolgte auf einem Agilent 2100- Bioanalyser. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Affymetrix; die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Protokoll hervor.

### **Array-Hybridisierung**

15 µg fragmentierter cRNA wurden mit 5 µl 3 nM Kontrolloligo B2, 15 µl 20x Hybridisierungskontrollen, 30 µl DMSO und 150 µl 2x Hybridisierungspuffer in einem Gesamtvolumen von 300 µl gemischt. Dieser Cocktail wurde für 5 min bei 99°C erhitzt, dann für 5 min bei 45°C inkubiert und 5 min bei 13.000 Upm, RT abzentrifugiert. 200 µl davon wurden in den Microchip pipettiert, der zuvor mit 200 µl 1x Hybridisierungspuffer bei 45°C für 10 min äquilibriert worden war. Nach Verschließen der Chip-Septen mit Klebeband (Tough Spots, Diversified Biotech) wurde der Chip bei 45°C und 60 Upm für 16-18 h in einem Hybridisierungssofen hybridisiert. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Affymetrix; die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem Protokoll hervor.

### Array-Detektionsreaktionen

Nach der Hybridisierung wurde der Chip entleert und mit 300 µl Waschpuffer A befüllt. Die Nachweisreaktionen wurden mit einem SAPE-Mix, bestehend aus 300 µl 2x MES-Puffer, 24 µl BSA (50 mg/ml) und 6 µl Streptavidin-Phycoerythrin (1 mg/ml) in einem Gesamtvolumen von 600 µl, sowie einer Antikörper-Mischung, bestehend aus 300 µl 2x MES-Puffer, 24 µl BSA (50 mg/ml) und 6 µl Ziegen-IgG (10 mg/ml) und 3,6 µl biotinylierter Antikörper (0,5 mg/ml) in einem Gesamtvolumen von 600 µl durchgeführt. Es wurde das FS450\_0004-Programm für sämtliche Wasch und Detektionsschritte verwendet. Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Affymetrix; die genaue Zusammensetzung der verwendeten Puffer geht aus dem jeweiligen Protokoll hervor.

### Datenanalyse

Nach Abschluß der Wasch- und Markierungsschritte wurden die Arrays mit Hilfe eines Affymetrix GeneChip Scanners (Affymetrix) eingelesen. Das resultierende Bild wurde zunächst durch Verwendung des Programms AFFYMETRIX MICROARRAY SUITE 5.0 (Affymetrix) ausgewertet, normalisiert und die Expressionswerte kalkuliert. Eine Auswertung der Transkriptom-Vergleiche wurde mit Hilfe des Programmes R (<http://www.r-project.org/>) durchgeführt. Dabei wurde für die statistische Auswertung mit R die Software Bioconductor benutzt [GENTLEMAN *et al.*, 2004], die Analyse der Transkriptomdaten wurde mit dem Paket LIMMA (linear models for microarray data) durchgeführt [SMYTH, 2004]. Bei der vergleichenden Analyse der experimentellen Arrays mit den Kontrollarrays wurden Gene herausgefiltert, die mindestens zweifach hoch- oder runterreguliert waren. Die Regulation wurde als signifikant betrachtet, wenn  $p < 0,05$  und der absolute Expressionswert nach Normalisierung  $> 40$  war. Diese Kriterien wurden auf die vergleichende Analyse von SG200AM1 auf Glas gegen Parafilm und Parafilm mit 100 µM 16-Hydroxypalmitinsäure angewandt.

Für die Cluster-Analyse der Gene des primären Kohlenstoffmetabolismus, die auf der hydrophoben Oberfläche unter beiden Bedingungen reprimiert waren wurden Gene, die nach FunCatDB eine funktionelle Rolle im primären Kohlenstoffmetabolismus zugeordnet werden konnte verwendet ([http://mips.gsf.de/cgi-bin/proj/funcatDB/search\\_advanced.pl?gene=2](http://mips.gsf.de/cgi-bin/proj/funcatDB/search_advanced.pl?gene=2)). Für diese Cluster-Analyse wurde das Programm dChip 2005 verwendet [LI UND WONG, 2001].

## 5 Literatur

**ADAMÍKOVÁ L., STRAUBE A., SCHULZ I. AND STEINBERG G. (2004)** Calcium signaling is involved in dynein-dependent microtubule organization. *Mol Biol Cell.* **15(4)**:1969-1980.

**AGRIOS, G.N. (2005)** Plant Pathology 5<sup>th</sup> edition. Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto.

**ALBERTI-SEGUI C., MORALES A.J., XING H., KESSLER M.M., WILLINS D.A., WEINSTOCK K.G., COTTAREL G., FECHTEL K. AND ROGERS B. (2004)**. Identification of potential cell-surface proteins in *Candida albicans* and investigation of the role of a putative cell-surface glycosidase in adhesion and virulence. *Yeast.* **21(4)**:285-302.

**ALONSO-MONGE R., NAVARRO G. F., MOLERO G., DIEZ O. R., GUSTIN M., PLA J., SANCHEZ. M. AND NOMBELA, C. (1999)**. Role of the mitogen activated protein kinase Hog1p in morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **181**:3058–3068.

**ALTSCHUL, S. F., GISH W., MILLER W., MYERS E. W., UND LIPMAN D. J. (1990)**. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* **215**:403-410.

**ALTSCHUL, S. F., MADEN, T. L., SCHAFER A. A., ZHANG J., ZHANG Z., MILLER W., AND LIPMAN D. J. (1997)**. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402.

**ANDREWS D. L., EGAN J. D., MAYORGA M. E. AND GOLD S. E. (2000)**. The *Ustilago maydis* *ubc4* and *ubc5* genes encode members of a MAP kinase cascade required for filamentous growth. *Mol Plant Microbe Interact.* **13**:781-786.

**AUSUBEL F.M., BRENNER R., KINGSTON R.E., MOORE D.D., SEIDMAN J.G., SMITH J.A., und STRUKL K. (1987)**. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc., USA.

**BAHN Y.S., KOJIMA K., COX G.M. AND HEITMAN J. (2006)** A unique fungal two-component system regulates stress responses, drug sensitivity, sexual development, and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Mol Biol Cell.* **17(7)**:3122-3135.

**BAHN Y.S., KOJIMA K., COX G.M. AND HEITMAN J. (2005)** Specialization of the HOG pathway and its impact on differentiation and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Mol Biol Cell.* **16(5)**:2285-2300.

**BAJAR A., PODILA G.K. AND KOLATTUKUDY P.E. (1991)**. Identification of a fungal cutinase promoter that is inducible by a plant signal via a phosphorylated trans-acting factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88(18)**:8208-8212.

**BAKKEREN G., KÄMPER J. AND SCHIRAWSKI J. (2008)**. Sex in smut fungi: Structure, function and evolution of mating-type complexes. *Fungal Genet Biol.* **45** Suppl 1:S15-21.

**BANUETT F., AND HERSKOWITZ I. (1994A)**. Morphological transitions in the life cycle of *Ustilago maydis* and their genetic control by the *a* and *b* loci. *Exp Mycol* **18**:247-266.

- BANUETT F. AND HERSKOWITZ I. (1994B).** Identification of *fuz7*, a *Ustilago maydis* MEK/MAPKK homolog required for  $\alpha$ -locus-dependent and -independent steps in the fungal life cycle. *Genes Dev.* **8**:1367-1378.
- BANUETT F. AND HERSKOWITZ I. (1996).** Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development.* **122**:2965–2976.
- BANUETT F. (1995)** Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen, that induces tumors in maize. *Annual Reviews of Genetics.* **29**:79–108.
- BASSE C.W., STUMPFERL S. AND KAHMANN R. (2000)** Characterization of a *Ustilago maydis* gene specifically induced during the biotrophic phase: evidence for negative as well as positive regulation. *Mol Cell Biol.* **20**(1):329–339.
- BAUER R., OBERWINKLER F. AND VÁNKY K. (1997).** Ultrastructural markers and systematics in smut fungi and allied taxa. *Can. J. Botany.* **75**:1273-1314
- BAKER L.G., SPECHT C.A., DONLIN M.J. AND LODGE J.K. (2007).** Chitosan, the deacetylated form of chitin, is necessary for cell wall integrity in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell.* **6**:855–867.
- BECHINGER, C., GIEBEL, K.F., SCHNELL, M., LEIDERER, P., DEISING, H.B. AND BASTMEYER, M. (1999)** Optical measurements of invasive forces exerted by appressoria of a plant pathogenic fungus. *Science.* **285**:1896–1899.
- BOHLMANN R., SCHAUWECKER F., BASSE C., AND KAHMANN R. (1994)** Genetic regulation of mating and dimorphism in *Ustilago maydis*. In *Advances in Molecular Genetics of Plant–Microbe Interactions*, Vol 3. Daniels, M.J. (ed.). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 239–45.
- BOTTIN A., KÄMPER J. AND KAHMANN R. (1996)** Isolation of a carbon source-regulated gene from *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet.* **253**:342-352.
- BÖLKER M., URBAN M., AND KAHMANN R. (1992).** The  $\alpha$  mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell.* **68**:441–450.
- BÖLKER M., BÖHNERT H.U., BRAUN K.H., GÖRL J. AND KAHMANN R. (1995A)** Tagging pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Mol. Gen. Genet.* **248**:547–552.
- BÖLKER M., GENIN S., LEHMLER C. UND KAHMANN R. (1995B).** Genetic regulation of mating and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Can J Botany.* **73**:320-25.
- BRACHMANN A. (2001)** Die frühe Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Genregulation durch das bE/bW-Heterodimer, Ludwig-Maximilian-University, Munich.
- BRACHMANN A., WEINZIERL G., KÄMPER J. AND KAHMANN R. (2001)** Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol.* **42**:1047-1063.
- BRACHMANN A., SCHIRAWSKI J., MÜLLER P. AND KAHMANN R. (2003)** An unusual MAP kinase is required for efficient penetration of the plant surface by *Ustilago maydis*. *EMBO J.* **22**(9):2199-2210.

- BRACHMANN A., KÖNIG J., JULIUS C. AND FELDBRÜGGE M. (2004)** A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics*. **272**:216-226.
- BUCHANAN B.B., GRUISSEM W. AND JONES R.L. (eds) (2000)**. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland.
- CABIB E., BLANCO N., GRAU C., RODRÍGUEZ-PEÑA J.M. AND ARROYO J. (2007)**. Crh1p and Crh2p are required for the cross-linking of chitin to beta(1-6)glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol Microbiol*. **63(3)**:921-935.
- CABIB E., FARKAS V., KOSÍK O., BLANCO N., ARROYO J. AND MCPHIE P. (2008)**. Assembly of the yeast cell wall. Crh1p and Crh2p act as transglycosylases *in vivo* and *in vitro*. *J Biol Chem*. **283(44)**:29859-29872.
- CHAMPE, S. P. AND EL-ZAYAT, A. A. (1989)**. Isolation of a sexual sporulation hormone from *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol*. **171**:3982–3988.
- CHRISTENSEN, J.J. (1963)** Corn smut caused by *Ustilago maydis*. *Am. Phytopathol. Soc. Monogr*. **2**:1–41.
- CIVELLI O. (2005)**. GPCR deorphanizations: the novel, the known and the unexpected transmitters. *Trends Pharmacol Sci*. **26(1)**:15-19.
- DEAN R.A. (1997)**. Signal pathways and appressorium morphogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol*. **35**:211–234.
- DEISING H.B. AND SIEGRIST J. (1995)**. Chitin deacetylase activity of the rust *Uromyces viciae-fabae* is controlled by fungal morphogenesis. *FEMS Microbiol. Lett*. **127**:207–212.
- DEISING H.B., WERNER S. AND WERNITZ M. (2000)**. The role of fungal appressoria in plant infection. *Microb. Infect*. **2**:1631–1641.
- DEZWAAN T.M., CARROLL A.M., VALENT B., SWEIGARD J.A.(1999)**. *Magnaporthe grisea* Pth11p is a novel plasma membrane protein that mediates appressorium differentiation in response to inductive substrate cues. *Plant Cell*. **11(10)**:2013-2030.
- DI STASIO M., BREFORT T., MENDOZA-MENDOZA A. AND KAHMANN R. (2009)**. The dual specificity phosphatase Rok1 negatively regulates mating and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol. in press*
- DI PIETRO A., GARCÍA-MACEIRA F.I., MÉGLECZ E. AND RONCERO M.I. (2001)**. A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Mol Microbiol*. **39(5)**:1140-1152.
- DIXON R.A. AND LAMB C. (1990)** Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Ann Rev Plant Mol Biol*. **41**:339–367.
- DIXON K.P., XU J.R., SMIRNOFF N. AND TALBOT N.J. (1999)**. Independent signaling pathways regulate cellular turgor during hyperosmotic stress and appressorium-mediated plant infection by *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell*. **11(10)**:2045-2058.
- DOEBLEY J. (1992)**. Mapping the genes that made maize. *Trends Genet*. **8**:302-307.

- DOEHLEMAN G., BERNDT P. AND HAHN M. (2006).** Different signalling pathways involving a Galpha protein, cAMP and a MAP kinase control germination of *Botrytis cinerea* conidia. *Mol Microbiol.* **59(3)**:821-835.
- DOEHLEMAN G., WAHL R., VRANES M., DE VRIES R.P., KÄMPER J. AND KAHMANN R. (2008a)** Establishment of compatibility in the *Ustilago maydis*/maize pathosystem. *J Plant Physiol.* **165(1)**:29-40
- DOEHLEMAN G., WAHL R., HORST R.J., VOLL L.M., USADEL B., POREE F., STITT M., PONS-KÜHNEMANN J., SONNEWALD U., KAHMANN R. AND KÄMPER J. (2008b).** Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. *Plant J.* **56(2)**:181-195.
- DOEHLEMAN G., VAN DER LINDE K., ABMANN D., SCHWAMMBACH D., HOF A., MOTHAMBI A., JACKSON D. AND KAHMANN R. (2009).** Pep1, a secreted effector protein of *Ustilago maydis*, is required for successful invasion of plant cells. *PLoS Pathog.* **5(2)**:e1000290.
- DOKE N., MIURA Y., SANCHEZ L.M., PARK H.J., NORITAKE T., YOSHIOKA H., AND KAWAKITA K. (1996).** The oxidative burst protects plants against pathogen attack: mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence--a review. *Gene.* **179(1)**:45-51.
- DÜRRENBARGER F., WONG K. AND KRONSTAD J. W. (1998).** Identification of a cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit required for virulence and morphogenesis in *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**:5684-5689.
- EDDINE, A., HANNEMANN, F. AND SCHÄFER, W. (2001)** Cloning and expression analysis of NhL1, a gene encoding an extracellular lipase from the fungal pea pathogen *Nectria haematococca* MP VI (*Fusarium solani* f. sp. *pisi*) that is expressed in planta. *Mol. Genet. Genomics.* **265**:215–224.
- EDDY S.R. (1995).** Multiple alignment using hidden Markov models. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol.* **3**:114-120.
- EISEN M. B., SPELLMAN P. T., BROWN P. O., AND BOTSTEIN D. (1998).** Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA.* **95**:14863-14868.
- EPSTEIN L., KAUR S., GOINS T., KWON Y.H. AND HENSON J.M. (1994).** Production of hyphopodia by wild-type and three transformants of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis*. *Mycologia* **86**:72–81.
- FLAISHMAN M.A. AND KOLATTUKUDY P.E. (1995).** Timing of fungal invasion using host's ripening hormone as a signal. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **91**:6579–83
- FLOR-PARRA, I., VRANES, M., KÄMPER, J. AND PÉREZ-MARTÍN, J. (2006).** Biz1, a zinc finger protein required for plant invasion by *Ustilago maydis*, regulates the levels of a mitotic cyclin. *Plant Cell.* **18**:2369–2387.
- FU Y., IBRAHIM A.S., FONZI W., ZHOU X., RAMOS C.R., AND GHANNOUM M.A. (1997)** Cloning and characterization of a gene (LIP1) which encodes a lipase from the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Microbiology.* **143**:331–340.



- GÁCSEER A., TROFA D., SCHÄFER W. AND NOSANCHUK J.D. (2007).** Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. *J Clin Invest.* **117(10)**:3049-3058.
- GARCÍA-MUSE T., STEINBERG G. AND PÉREZ-MARTÍN J. (2003).** Pheromone-induced G2 arrest in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell.* **2(3)**:494-500.
- GARRIDO E., VOSS U., MÜLLER P., CASTILLO-LLUVA S., KAHMANN R. AND PÉREZ-MARTÍN J. (2004).** The induction of sexual development and virulence in the smut fungus *Ustilago maydis* depends on Crk1, a novel MAPK protein. *Genes Dev.* **18**:3117-3130
- GENTLEMAN R.C., CAREY V.J., BATES D.M., BOLSTAD B., DETTLING M., DUDOIT S., ELLIS B., ET AL. (2004).** Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* **5(10)**:R80.
- GILBERT R.D., JOHNSON A.M. AND DEAN, R.A. (1996).** Chemical signals responsible for appressorium formation in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **48**:335–346.
- GOLD S., DUNCAN G., BARRETT K. AND KRONSTAD J. (1994).** cAMP regulates morphogenesis in the fungal pathogen *Ustilago maydis*. *Genes Dev.* **8**:2805-2816.
- GOLD S. E., BAKKEREN G., DAVIES J. E., AND KRONSTAD J. W. (1994B).** Three selectable markers for transformation of *Ustilago maydis*. *Gene* **142**:225-230.
- GOLUB T. R., SLONIM D. K., TAMAYO P., HUARD C., GAASENBEE, M., MESIROV J. P., COLLIER H., LOH M. L., DOWNING J. R., CALIGIURI M. A., BLOOMFIELD C. D., AND LANDER E. S. (1999).** Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science.* **286**:531-537.
- GOVRIN E.M., RACHMILEVITCH S., TIWARI B.S., SOLOMON M. AND LEVINE A. (2006).** An elicitor from *Botrytis cinerea* induces the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana* and other plants and promotes the gray mold disease. *Phytopathology.* **96**:299-307.
- FELIX G., REGENASS M. AND BOLLER T. (1993).** Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: Induction of extracellular alkalinization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state, *Plant J.* **4**:307–316.
- FENG D. D., LUO Z., ROH S. G., HERNANDEZ M., TAWADROS N., KEATING D. J. AND CHEN C., (2006).** Reduction in voltage-gated K<sup>+</sup> currents in primary cultured rat pancreatic beta-cells by linoleic acids. *Endocrinology.* **147**:674-682.
- FANKHAUSER N. AND MÄSER P. (2005).** Identification of GPI anchor attachment signals by a Kohonen self-organizing map. *Bioinformatics.* **21(9)**:1846-1852.
- HAHN M. AND MENDGEN K. (1997).** Characterization of in planta-induced rust genes isolated from a haustorium-specific cDNA library. *Mol Plant Microbe Interact.* **10(4)**:427-437.

- HARTMANN H. A., KAHMANN R. AND BÖLKER M. (1996).** The pheromone response factor coordinates filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *EMBO J.* **15**:1632-1641.
- HARTMANN H. A., KRÜGER J., LOTTSPEICH F. AND KAHMANN R. (1999).** Environmental signals controlling sexual development of the corn Smut fungus *Ustilago maydis* through the transcriptional regulator Prf1. *Plant Cell.* **11**:1293-1306.
- HAWTHORNE B.T., REES-GEORGE J. AND CROWHURST R.N. (2001).** Induction of cutinolytic esterase activity during saprophytic growth of cucurbit pathogens, *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* races one and two (*Nectria haematococca* MPI and MPV, respectively). *FEMS Microbiol Lett.* **194**(2):135-141.
- HERINGA, J. (1999).** Two strategies for sequence comparison: profile-preprocessed and secondary structure-induced multiple alignment. *Comput Chem* **23**:341-364.
- HIRASAWA A., HARA T., KATSUMA S., ADACHI T. AND TSUJIMOTO G. (2008).** Free fatty acid receptors and drug discovery. *Biol Pharm Bull.* **31**(10):1847-1851.
- HOCH H.C., STAPLES R.C., WHITEHEAD B., COMEAU J. AND WOLF E.D.(1987).** Signaling for growth orientation and cell differentiation by surface topography in *Uromyces*. *Science* **235**:1659–1662.
- HOFFMAN C. S. AND WINSTON F. (1987).** A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *E. coli*. *Gene.* **57**:267-272.
- HOLLIDAY R. (1974).** *Ustilago maydis*. In Handbook of Genetics, R. C. King, ed. (New York, USA, Plenum Press), pp. 575-595.
- HOLLOMAN W.K., SCHIRAWSKI J AND HOLLIDAY R. (2008)** The homologous recombination system of *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol.* 45 Suppl1: S31-9.
- HORST R.J., ENGELSDORF T., SONNEWALD U. AND VOLL L.M. (2008)** Infection of maize leaves with *Ustilago maydis* prevents establishment of C4 photosynthesis. *J Plant Physiol.* **165**(1):19-28.
- HOWARD R.J., FERRARI M.A., ROACH D.H. AND MONEY, N.P. (1991).** Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**(24):11281-11284.
- INNIS M. A., GELFAND D. H., SNINSKY J. J., AND WHITE T. J., EDS. (1990).** PCR Protocols: a guide to methods and applications. (San Diego, USA, Academic Press).
- JAEGER K.E., DIJKSTRA B.W. AND REETZ M.T. (1999)** Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**:315–351.
- JELITTO T.C., PAGE H.A. AND READ N.D. (1994).** Role of external signals in regulating the pre-penetration phase of infection by the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Planta* **194**:471–77.
- KAFFARNIK F., MÜLLER P., LEIBUNDGUT M., KAHMANN R. AND FELDBRÜGGE M. (2003).** PKA and MAPK phosphorylation of Prf1 allows promoter discrimination in *Ustilago maydis*. *EMBO Journal*, **22**(21):5817-5826.

- KAHMANN R. AND KÄMPER J. (2004).** *Ustilago maydis*: how its biology relates to pathogenic development. *New Phytologist*, **164**:31–42.
- KAMAKURA T., YAMAGUCHI S., SAITOH K., TERAOKA T. AND YAMAGUCHI I. (2002).** A novel gene, CBP1, encoding a putative extracellular chitin-binding protein, may play an important role in the hydrophobic surface sensing of *Magnaporthe grisea* during appressorium differentiation. *Mol Plant Microbe Interact.* **15(5)**:437-444.
- KÄMPER J. (2004).** A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **271**:103-110.
- KÄMPER, J., KAHMANN, R., BÖLKER, M., MA, L.-J., BREFORT, T., SAVILLE, B.J., BANUETT, F., ET AL. (2006)** Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature*. **444**:97-101.
- KEON, J. P., WHITE, G. A. AND HARGREAVES, J. A. (1991)** Isolation, characterization and sequence of a gene conferring resistance to the systemic fungicide carboxin from the maize smut pathogen, *Ustilago maydis*. *Curr Genet.* **19**:475-481.
- KERSHAW M.J. AND TALBOT N.J. (1998).** Hydrophobins and repellents: Proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis. *Fungal Gen. Biol.* **23**:18–33.
- KIM Y.K., LI D. AND KOLATTUKUDY P.E. (1998)** Induction of Ca<sup>2+</sup>-calmodulin signaling by hard-surface contact primes *Colletotrichum gloeosporoides* conidia to germinate and form appressoria. *J. Bacteriol.* **180**:5144–5150.
- KLOSE J., DE SA M.M. AND KRONSTAD J.W. (2004)** Lipid-induced filamentous growth in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol.* **52(3)**:823-835.
- KLOSE J. AND KRONSTAD J.W. (2006)** The multifunctional  $\beta$ -oxidation enzyme is required for full symptom development by the biotrophic Maize pathogen *Ustilago maydis*. *Eukaryot. Cell.* **5(12)**:2047-2061.
- KLOSTERMAN S.J., MARTINEZ-ESPINOZA A.D., ANDREWS D.L., SEAY J.R. AND GOLD S.E. (2008).** Ubc2, an ortholog of the yeast Ste50p adaptor, possesses a basidiomycete-specific carboxy terminal extension essential for pathogenicity independent of pheromone response. *Mol. Plant Microbe Interact.* **21**:110-121.
- KOJIC, M. AND HOLLOMAN W. K. (2000)** Shuttle vectors for genetic manipulations in *Ustilago maydis*. *Can J Microbiol.* **46**:333-338.
- KOLATTUKUDY P.E (2001)** Cutin from plants. In *Polyesters I: Biological systems and Biotechnological production*. Vol. 3a. Y. Doi and A. Steinbüchel, eds. (Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA) p.1-35.
- KOLATTUKUDY, P. E., ROGERS, L. M., LI, D., HWANG, C. S. AND FLAISHMAN, M. A. (1995)** Surface signaling in pathogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **92**:4080–4087.
- KRONSTAD, J. W., WANG, J., COVERT, S. F., HOLDEN, D. W., MCKNIGHT, G. L. AND LEONG, S. A. (1989)** Isolation of metabolic genes and demonstration of gene disruption in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Gene.* **79**: 97-106.

**KRÜGER J., LOUBRADOU G., REGENFELDER E., HARTMANN A. AND KAHMANN R. (1998)** Crosstalk between cAMP and pheromone signalling pathways in *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet.* **260(2-3)**:193-198.

**KUO, K.-C. (1999).** Germination and appressoria formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Proc Natl Sci Counc Repub China B.* **23**:126–132.

**LACADENA J., ALVAREZ-GARCÍA E., CARRERAS-SANGRÀ N., HERRERO-GALÁN E., ALEGRE-CEBOLLADA J., GARCÍA-ORTEGA L., OÑADERRA M., GAVILANES J.G. AND MARTÍNEZ DEL POZO A. (2007).** Fungal ribotoxins: molecular dissection of a family of natural killers. *FEMS Microbiol Rev.* **31(2)**:212-237.

**Laity C., Giasson L., Campbell R. and Kronstad J. (1995)** Heterozygosity at the b mating-type locus attenuates fusion in *Ustilago maydis*. *Curr Genet.* **27(5)**:451-459.

**LARRAYA L.M., BOYCE K.J., SO A., STEEN B.R., JONES S., MARRA M. AND KRONSTAD J.W. (2005).** Serial analysis of gene expression reveals conserved links between protein kinase A, ribosome biogenesis, and phosphate metabolism in *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell.* **4(12)**:2029-2043.

**LEE Y.W. AND DEAN R.A. (1993).** cAMP regulates infection structure formation in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell.* **5**: 693-700.

**LENGELER K.B. AND KOTHE E (1999).** Mated: a putative peptide transporter of *Schizophyllum commune* expressed in dikaryons. *Curr Genet.* **36(3)**:159-164.

**LEQUEU, J., FAUNCONNIER, M-L., CHAMMAI, A., BRONNER, R. AND BLÉE. (2003)** Formation of plant cuticle: evidence for the occurrence of the peroxxygenase pathway. *The Plant Journal.* **36**:155-164.

**LI C. AND WONG W.H. (2001).** Model-based analysis of oligonucleotide arrays: Expression index computation and outlier detection. *PNAS.* **98(1)**:31-36.

**LI C. AND WONG W. H. (2003).** DNA-Chip Analyzer (dChip). In *The analysis of gene expression data: methods and software*, E. S. G. by Giovanni Parmigiani, Rafael A. Irizarry, Scott L. Zeger, ed. (Springer).

**LIU S. AND DEAN R.A. (1997).** G protein alpha subunit genes control growth, development, and pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Microbe Interact.* **10(9)**:1075-1086.

**LOUBRADOU G., BRACHMANN A., FELDBRÜGGE M. AND KAHMANN R. (2001).** A homologue of the transcriptional repressor Ssn6p antagonizes cAMP signalling in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol.* **40(3)**:719-730.

**MARTIN, J. T. AND JUNIPER, B. E. (1970)** *The Cuticles of Plants*. New York: St. Martin's

**MARTINEZ-RUIZ A., GARCIA-ORTEGA L., KAO R., LACADENA J., ONADERRA M., MANCHENO J.M., DAVIES J. ET AL. (2001).** RNase U2 and  $\alpha$ -sarcin: a study of relationships. *Methods Enzymol.* **341**:335–351.

**MELNICK L. AND SHERMAN F. (1993).** The gene clusters ARC and COR on chromosomes 5 and 10, respectively, of *Saccharomyces cerevisiae* share a common ancestry. *J Mol Biol.* **233(3)**:372-388.

- MENDOZA-MENDOZA A., BERNDT P., DJAMEI A., WEISE C., LINNE U., MARAHIEL M., VRANEŠ M., KÄMPER J. AND KAHMANN R. (2009A)** Physical-chemical plant-derived signals induce differentiation in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* **71**(4):895-911.
- MENDOZA-MENDOZA A., ESKOVA A., CZAJKOWSKI R. AND KAHMANN R. (2009B)** Hap2 regulates the pheromone response transcription factor *prf1* in *Ustilago maydis* *Mol. Microbiol. in press*
- MITCHELL T.K. AND DEAN R.A. (1995).** The cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit is required for appressorium formation and pathogenesis by the rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell* **7**:1869-1878.
- MOLINA, L. AND KAHMANN R. (2007).** An *Ustilago maydis* gene involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification is required for virulence. *The Plant Cell.* **9**(7):2293-2309.
- MÜLLER, P., WEINZIERL, G., BRACHMANN, A., FELDBRÜGGE, M., AND KAHMANN R. (2003).** Mating and pathogenic development of the Smut fungus *Ustilago maydis* are regulated by one mitogen-activated protein kinase cascade. *Eukaryot Cell.* **2**(6):1187-1199.
- MÜLLER O., KAHMANN R., AGUILAR G., TREJO-AGUILAR B., WU A. AND DE VRIES R.P. (2008A).** The secretome of the maize pathogen *Ustilago maydis*. *Fungal Genet. Biol.* **45 Suppl1**:S63-70.
- MÜLLER O., SCHREIER P.H., UHRIG J.F. (2008B).** Identification and characterization of secreted and pathogenesis-related proteins in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics.* **279**(1):27-39.
- MUNKACSI A.B., STOXEN S., AND MAY G. (2007).** Domestication of maize, sorghum, and sugarcane did not drive the divergence of their smut pathogens. *Evolution.* **61**:388-403.
- NADAL M., GARCIA-PEDRAJAS M.D., AND GOLD S.E. (2008).** Dimorphism in fungal plant pathogens. *FEMS Microbiol. Lett.* **284**:127-134.
- NEVOIGT E., AND STAHL U. (1997).** Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**:231-241.
- NOVERR, M. C. AND HUFFNAGLE, G. B. (2004).** Regulation of *Candida albicans* morphogenesis by fatty acid metabolites. *Infect. Immun.* **72**:6206-6210.
- NÜRNBERGER T., NENNSTIEL D., JABS T., SACKS W.R., HAHLBROCK K. AND SCHEEL D. (1994).** High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes trigger multiple defense responses. *Cell.* **78**:449-460.
- ORBACH E. AND FINKELSTEIN A. (1980)** The nonelectrolyte permeability of planar lipid bilayer membranes, *J. Gen. Physiol.* **75**:427.
- PEREZ-CANADILLAS J.M., GUENNEUGUES M., CAMPOS-OLIVAS R., SANTORO J., MARTINEZ DEL POZO A., GAVILANES J.G., RICO M. BRUIX M. (2002)** Backbone dynamics of the cytotoxic ribonuclease  $\alpha$ -sarcin by <sup>15</sup>N NMR relaxation methods. *J Biomol NMR.* **24**:301-316.

**POHL E.E., VOLTCHENKO A.M., RUPPRECHT A. (2008).** Flip-flop of hydroxy fatty acids across the membrane as monitored by proton-sensitive microelectrodes. *Biochem Biophys Acta*. **1778(5)**:1292-1297.

**PUHALLA, J.E. (1968).** Compatibility reactions on solid medium and interstrain inhibition in *Ustilago maydis*. *Genetics*. **60**:461-474.

**PURDY, R.E., AND KOLATTUKUDY, P.E. (1975).** Hydrolysis of plant cuticle by plant pathogens. Purification, amino acid composition, and molecular weight of two isozymes of cutinase and a non-specific esterase from *Fusarium solani f. pisi*. *Biochemistry*. **14**:2824-2831.

**REGENFELDER E., SPELLIG T., HARTMANN A., LAUENSTEIN S., BÖLKER M., AND KAHMANN R. (1997).** G proteins in *Ustilago maydis*: transmission of multiple signals? *EMBO J*. **16(8)**:1934-1942.

**REIS H., PFIFFI S. AND HAHN M. (2005).** Molecular and functional characterization of a secreted lipase from *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathol*. **6(3)**:257–267.

**ROWELL, J.B. AND DEVAY, J.E. (1954).** Genetics of *Ustilago zeae* in relation to basic problems of its pathogenicity. *Phytopathology*. **44**:356–362.

**ROWELL, J.B. (1955).** Functional role of compatibility factors: an in vitro test for sexual compatibility with haploid lines of *Ustilago zeae*. *Phytopathology*. **45**:370-374.

**RUI O. AND HAHN M. (2007).** The Slr2-type MAP kinase Bmp3 of *Botrytis cinerea* is required for normal saprotrophic growth, conidiation, plant surface sensing and host tissue colonization. *Molecular Plant Pathol*. **8**:173-184.

**RUIZ-HERRERA J., LEON C.G., CARABEZ-TREJO A. AND REYES-SALINAS E. (1996).** Structure and chemical composition of the cell walls from the haploid yeast and mycelial forms of *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol*. **20(2)**:133-142.

**SAMBROOK J., FRISCH E. F., und MANIATIS T. (1989).** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbour, New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press).

**SCHERER, M., HEIMEL, K., STARKE, V. AND KÄMPER, J. (2006).** The Clp1 protein is required for clamp formation and pathogenic development of *Ustilago maydis*. *Plant Cell*. **18**:2388–2401.

**SCHIRAWSKI J., BÖHNERT H.U., STEINBERG G., SNETSELAAR K., ADAMIKOWA L., KAHMANN R. (2005).** Endoplasmic reticulum glucosidase II is required for pathogenicity of *Ustilago maydis*. *Plant Cell*. **17(12)**:3532-3543.

**SCHULTZ, J., MILPETZ, F., BORK, P., und PONTING, C. P. (1998).** SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**:5857-5864.

**SCHULZ B., BANUETT F., DAHL M., SCHLESINGER R., SCHÄFER W., MARTIN T., HERSKOWITZ I., and KAHMANN R. (1990).** The *b* alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell*. **60**:295-306.

- SEGMÜLLER N, ELLENDORF U, TUDZYNSKI B AND TUDZYNSKI P. (2007)** BcSAK1, a stress-activated mitogen-activated protein kinase, is involved in vegetative differentiation and pathogenicity in *Botrytis cinerea*. *Eukaryot Cell*. **6(2)**:211-221.
- SEXTON A.C AND HOWLETT B.J. (2006)**. Parallels in fungal pathogens on plant and animal hosts. *Eukaryot Cell*. **5(12)**:1941-1949.
- SGARLATA C. AND PÉREZ-MARTÍN J. (2005)**. Inhibitory phosphorylation of a mitotic cyclin-dependent kinase regulates the morphogenesis, cell size and virulence of the smut fungus *Ustilago maydis*. *J Cell Sci*. **118(16)**:3607-3622.
- SKAMNIOTI P. AND GURR S.J. (2007)**. *Magnaporthe grisea* Cutinase2 Mediates Appressorium Differentiation and Host Penetration and Is Required for Full Virulence. *The Plant Cell*. **19**:2674–2689.
- SMYTH G.K. (2004)**. Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology* **3**, No. 1, Article 3.
- SNETSELAAR, K. M. AND MIMS, C. W. (1992)**. Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia*. **84**:193-203.
- SNETSELAAR, K.M. AND MIMS, C.W. (1993)**. Infection of maize by *Ustilago maydis*: light and electron microscopy. *Phytopathology*. **83**:843–850.
- SNETSELAAR K.M. AND MIMS C.W. (1994)**. Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. *Mycol. Res.* 347–55.
- SNETSELAAR K.M., BÖLKER M. AND KAHMANN R. (1996)**. *Ustilago maydis* mating hyphae orient their growth toward pheromone. *Fungal Genet Biol.* **20(4)**:299-312.
- SONNHAMMER E. L., EDDY S. R., und DURBIN R. (1997)**. Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments. *Proteins*. **28**:405-420.
- SOUTHERN E. M. (1975)**. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* **98**:503-517.
- SPELLING T., BÖLKER M., LOTTSPEICH F., FRANK R. W. AND KAHMANN R. (1994)**. Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J.* **13**:1620–1627.
- SPELLIG T., BOTTIN A. AND KAHMANN R. (1996)**. Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Molecular and General Genetics* **252**:503–509.
- STAPLES R.C. (1985)**. The development of infection structures by the rusts and other fungi. *Microbiol. Sci.* **2**: 193–194, 197–198.
- STAPLES, R.C. AND HOCH, H.C. (1997)**. Physical and chemical cues for spore germination and appressorium formation by fungal pathogens. In: Carroll, G.C., Tudzynski, P. (Eds.), *Plant Relationships. The Mycota, V part A*. Springer, Berlin, pp. 27–40.

- STEINBERG G., SCHLIWA M., LEHMLER C., BÖLKER M., KAHMANN R. AND MCINTOSH J.R. (1998).** Kinesin from the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis* is involved in vacuole formation and cytoplasmic migration. *J Cell Sci.* **111(15)**:2235-2246.
- STEINBERG G., WEDLICH-SÖLDNER R., BRILL M. AND SCHULZ I. (2001).** Microtubules in the fungal pathogen *Ustilago maydis* are highly dynamic and determine cell polarity. *J Cell Sci.* **114**:609–622.
- STEINBERG G. AND PEREZ-MARTIN J. (2008).** *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. *Trends Cell Biol.* **18(2)**:61-67.
- STRUCK C., HAHN M. AND MENDGEN K. (1996).** Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase Activity in Spores, Germ Tubes, and Haustoria of the Rust Fungus *Uromyces viciae-fabae*. *Fungal Genet Biol.* **20(1)**:30-35.
- TALBOT, N.J. (2003).** On the trail of a cereal killer: Exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**:177–202.
- TAKANO Y., KIKUCHI T., KUBO Y., HAMER J.E., MISE K. AND FURUSAWA I. (2000).** The *Colletotrichum lagenarium* MAP kinase gene CMK1 regulates diverse aspects of fungal pathogenesis. *Mol Plant Microbe Interact.* **13(4)**:374-83.
- TEERTSTRA W.R., VAN DER VELDEN G.J., DE JONG J.F., KRUIJTZER J.A., LISKAMP R.M., KROON-BATENBURG L.M., MÜLLER W.H., GEBBINK M.F. AND WÖSTEN H.A. (2009).** The filament specific rep1-1 repellent of the phytopathogen *Ustilago maydis* forms functional surface-active amyloid-like fibrils. *J Biol Chem.* 2009 Jan 21. [Epub ahead of print]
- TEERTSTRA W.R., DEELSTRA H.J., VRANES M., BOHLMANN R., KAHMANN R., KÄMPER J. AND WÖSTEN HA. (2006).** Repellents have functionally replaced hydrophobins in mediating attachment to a hydrophobic surface and in formation of hydrophobic aerial hyphae in *Ustilago maydis*. *Microbiology.* **152(12)**:3607-3612.
- TETKO I.V., GASTEIGER J., TODESCHINI R., MAURI A., LIVINGSTONE D., ERTL P., PALYULIN V.A., RADCHENKO E.V., ZEFIROV, N.S., MAKARENKO, A.S., TANCHUK, V.Y. AND PROKOPENKO, V. V. (2005).** Virtual computational chemistry laboratory - design and description, *J. Comput. Aid. Mol. Des.* **19**:453-463.
- TSUKUDA T., CARLETON S., FOTHERINGHAM S. AND HOLLOMAN W.K. (1988).** Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Molecular and Cellular Biology.* **8**:3703–3709.
- UCHIYAMA, T. AND OKUYAMA, K. (1990).** Participation of *Oryza sativa* leaf wax in appressorium formation by *Pyricularia oryzae*. *Phytochemistry.* **29(1)**:91–92.
- URBAN M., KAHMANN R., AND BÖLKER M. (1996).** Identification of the pheromone response element in *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet.* **251(1)**:31-37.
- VANDER P., VARUM K.M., DOMARD A., EL GUEDDARI N.E. AND MOERSCHBACHER B.M. (1998).** Comparison of the ability of partially *N*-acetylated chitosans and chitoooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves, *Plant Physiol.* **118**:1353–1359.



- VAN KAN J.A., VAN'T KLOOSTER J.W., WAGEMAKERS C.A., DEES D.C. AND VAN DER VLUGT-BERGMANS C.J. (1997)** Cutinase A of *Botrytis cinerea* is expressed, but not essential, during penetration of gerbera and tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**:30–38.
- VOIGT C.A., SCHÄFER W. AND SALOMON S. (2005).** A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals. *Plant J.* **42**(3):364–375.
- WANG, J., HOLDEN, D. W. AND LEONG, S. A. (1988).** Gene transfer system for the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **85**:865–869.
- WEBER I., GRUBER C. AND STEINBERG G. (2003).** A Class-V Myosin Required for Mating, Hyphal Growth, and Pathogenicity in the Dimorphic Plant Pathogen *Ustilago maydis*. *Plant Cell.* **15**:2826–2842.
- WÖSTEN H.A., BOHLMANN R., ECKERSKORN C., LOTTSPEICH F., BÖLKER M. AND KAHMANN R. (1996).** A novel class of small amphipathic peptides affect aerial hyphal growth and surface hydrophobicity in *Ustilago maydis*. *EMBO J.* **15**(16):4274–4281.
- WYNN W.K. (1976).** Appressorium formation over stomates by the bean rust fungus: Response to a surface contact stimulus. *Phytopathology.* **66**:136–146.
- XU J.R. AND HAMER J.E. (1996).** MAP kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation and pathogenic growth in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Genes Dev.* **10**:2696–2706.
- XUE C., HSUEH Y.P. AND HEITMAN J. (2008).** Magnificent seven: roles of G protein-coupled receptors in extracellular sensing in fungi. *FEMS Microbiol Rev.* **32**(6):1010–1032.
- YAMAUCHI J., TAKAYANAGI N., KOMEDA K., TAKANO Y. AND OKUNO T. (2004)** cAMP-pKA signaling regulates multiple steps of fungal infection cooperatively with Cmk1 MAP kinase in *Colletotrichum lagenarium*. *Mol Plant Microbe Interact.* **17**(12):1355–1365.
- YANG Z. AND DICKMAN M.B. (1999).** Molecular cloning and characterization of Ct-PKAR, a gene encoding the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase in *Colletotrichum trifolii*. *Arch Microbiol.* **171**(4):249–256.
- ZABKA V., STANGL M., BRINGMANN G., VOGG G., RIEDERER M., AND HILDEBRANDT U. (2008).** Host surface properties affect prepenetration processes in the barley powdery mildew fungus. *New Phytol.* **177**(1):251–263.
- ZARNACK K., EICHHORN H., KAHMANN R. AND FELDBRÜGGE M. (2008)** Pheromone regulated target genes respond differentially to MAPK phosphorylation of transcription factor Prf1. *Mol Microbiol.* **69**(4):1041–1053.
- ZHAO X., KIM Y., PARK G. AND XU JR (2005)** A mitogen-activated protein kinase cascade regulating infection-related morphogenesis in *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell.* **17**(4):1317–1329.

**ZHENG L., CAMPBELL M., MURPHY J., LAM S. AND XU J.R. (2000).** The BMP1 gene is essential for pathogenicity in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Microbe Interact.* **13**(7):724-732.

## 6 Anhang

**Tabelle 9: Differentiell regulierte Gene nach zwei Stunden SG200 Glas vs. Parafilm**

log <sub>2</sub> Foldchange	P.Value	um Nummer	Annotation
3.141832071	0.001056	um03605	BETA-FRUCTOFURANOSIDASE 1 PRECURSOR (EC 3.2.1.26) (SUCROSE-6-PHOSPHATE HYDROLASE 1) (INVERTASE 1).
1.766982493	0.0212169	um02115	MANDELATE RACEMASE (EC 5.1.2.2).
1.728732536	0.0100797	um01025	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.076450105	0.009404	um01117	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.00746816	0.0083287	um11214	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.004499125	0.0011511	um04480	ALCOHOL DEHYDROGENASE (EC 1.1.1.1) (ADH-T).
-1.000082574	0.0403299	um02301	TRANSCRIPTION FACTOR FST12.
-1.028173073	0.0483473	um01744	SODIUM TRANSPORT ATPASE 2 (EC 3.6.3.7).
-1.038202985	0.0237956	um02715	3-KETOACYL-COA THIOLASE, PEROXISOMAL PRECURSOR (EC 2.3.1.16) (BETA- KETOTHIOLASE) (ACETYL-COA ACYLTRANSFERASE) (PEROXISOMAL 3-OXOACYL- COA THIOLASE).
-1.053696231	0.0178735	um03411	XYNA_ASPAK ENDO-1,4-BETA-XYLANASE A PRECURSOR (XYLANASE A) (1,4-BETA-D-XYLAN
-1.054770205	0.0091602	um05291	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.056064024	0.0180291	um02492	SYRINGOMYCIN BIOSYNTHESIS ENZYME-LIKE PROTEIN.
-1.060757182	0.0167474	um03658	HYPOTHETICAL 66.9 KDA PROTEIN.
-1.070818585	0.0401268	um03177	PEROXISOMAL MEMBRANE PROTEIN PMP20.
-1.086743384	0.0129931	um00638	CHITIN DEACETYLASE PRECURSOR (EC 3.5.1.41).
-1.095219549	0.017504	um05103	ATP SULPHURYLASE (EC 2.7.7.4).
-1.128253185	0.0060296	um02178	PEPSINOGEN A FORM IIA (EC 3.4.23.1).
-1.139873389	0.0018583	um01232	CYSTEINE PROTEINASE 1 (EC 3.4.22.40) (Y3) (BLEOMYCIN HYDROLASE) (BLM HYDROLASE).
-1.139893204	0.0192162	um02336	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.147679095	0.0023746	um11795	MICROSOMAL GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 3 (EC 2.5.1.18) (MICROSOMAL GST- 3) (MICROSOMAL GST-III).
-1.153277402	0.0042727	um04145	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.158159672	0.0031794	um04484	CHOLINE-SULFATASE (EC 3.1.6.6).
-1.1705549	0.0437182	um01756	TRANSMEMBRANE TRANSPORT PROTEIN-LIKE.
-1.186427319	0.0122903	um04347	SEXUAL DIFFERENTIATION PROCESS PROTEIN ISP4.
-1.187305591	0.0088554	um03977	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.197290879	0.0431312	um00371	OPSIN.
-1.198417089	0.0054722	um04742	STOMATIN-LIKE PROTEIN.
-1.201257098	0.0065019	um00037	NEURULA-SPECIFIC FERRODOXIN REDUCTASE-LIKE PROTEIN.
-1.205105632	0.0261212	um06042	FLAVONOL SYNTHASE (EC 1.14.11.-) (FLS).
-1.215176373	0.001432	um01017	HYPOTHETICAL 102.7 KDA PROTEIN IN PRP16-SRP40 INTERGENIC REGION.
-1.221875502	0.0056883	um04483	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.22740416	0.0022187	um02717	PUTATIVE TRANSCRIPTIONAL REGULATOR.
-1.243401995	0.0006683	um04897	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.284750937	0.0016042	um05766	PROBABLE SUPPRESSOR PROTEIN OF MITOCHONDRIAL HISTONE MUTANT.
-1.286753462	0.0004383	um04796	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN.

-1.306152226	0.0010778	um10062	related to monooxygenase
-1.329232735	0.027172	um05642	ABC TRANSPORTER.
-1.337550496	0.0241309	um04630	MUS81 ENDONUCLEASE.
-1.339353707	0.0042168	um04171	HYPOTHETICAL 28.9 KDA PROTEIN IN CLN1-RAD14 INTERGENIC REGION.
-1.355453752	0.0239041	um11229	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.362222162	0.0016789	um01005	ATP CITRATE LYASE (ATP CITRATE LYASE, SUBUNIT 1) (EC 4.1.3.8).
-1.375459011	0.0028834	um11795	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.398282229	0.0281278	um03506	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.398677323	0.0249383	um05222	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.402252807	0.0055197	um00958	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.40781675	0.0075483	um11266	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.449515563	0.0236209	um00723	RELATED TO STRESS RESPONSE PROTEIN RDS1P.
-1.456635934	0.0025237	um03779	GALACTINOL SYNTHASE, ISOFORM GOLS-1 (EC 2.4.1.123).
-1.473747458	0.0139358	um11440	WD REPEAT PROTIEIN.
-1.49583909	0.0377659	um02801	NADP-SPECIFIC GLUTAMATE DEHYDROGENASE (EC 1.4.1.4) (NADP-GDH).
-1.502555562	0.0371958	um01805	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN.
-1.5180016	0.0034424	um04444	PEROXISOMAL INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN.
-1.526680324	0.0068169	um04189	BIFUNCTIONAL P-450:NADPH-P450 REDUCTASE PROTEIN (FATTY ACID OMEGA- HYDROXYLASE) (P450FOXY) [INCLUDES: CYTOCHROME P450 505 (EC 1.14.14.1); NADPH-CYTOCHROME P450 REDUCTASE (EC 1.6.2.4)].
-1.596860348	0.0008766	um10905	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.597366099	0.0003461	um03994	PYRUVATE DECARBOXYLASE ISOZYME 1 (EC 4.1.1.1).
-1.620891275	0.0019809	um10474	MACROPHAGE ACTIVATING GLYCOPROTEIN.
-1.62399316	0.0052906	um04922	ALDO-KETO REDUCTASE FAMILY 1 MEMBER C4 (EC 1.1.1.-) (CHLORDEKONE REDUCTASE) (EC 1.1.1.225) (CDR) (3-ALPHA-HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE) (EC 1.1.1.50) (3-ALPHA-HSD) (DIHYDRODIOL DEHYDROGENASE 4) (DD4) (HAKRA).
-1.639773761	0.0141211	um02625	UREA ACTIVE TRANSPORTER.
-1.658190478	0.0037221	um15009	conserved hypothetical protein
-1.658934254	0.0061518	um02985	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.685400203	0.0421113	um03923	HYPOTHETICAL 20.7 KDA PROTEIN (FRAGMENT).
-1.696130333	0.0022747	um02161	PROTEIN KINASE C.
-1.726181081	0.0001279	um10062	FLAVIN-CONTAINING MONOOXYGENASE 3 (EC 1.14.13.8).
-1.743220323	0.0318639	um02172	ALDEHYDE REDUCTASE II (EC 1.1.1.2).
-1.746601976	0.0002991	um01888	CARBOXYPEPTIDASE CPDS PRECURSOR (EC 3.4.16.-).
-1.755463276	0.0434586	um05889	AMMONIUM TRANSPORTER.
-1.786366962	0.0009874	um06063	GLUTAMATE DECARBOXYLASE (EC 4.1.1.15).
-1.800861827	0.0051263	um11742	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.822986498	0.0022087	um03139	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.827961695	0.0006073	um10339	FATTY ACID SYNTHASE (EC 2.3.1.85) (CONTAINS: EC 2.3.1.38, EC 2.3.1.39, EC 2.3.1.41, EC 1.1.1.100, EC 4.2.1.60, EC 4.2.1.61, EC 1.3.1.10, AND EC 3.1.2.14).
-1.848728904	0.0080071	um02215	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.907775148	0.0027969	um02171	PARASITIC PHASE-SPECIFIC PROTEIN PSP-1.
-1.928379875	0.0161308	um04575	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.931501949	0.0050643	um10031	PUTATIVE EMBRYO-SPECIFIC PROTEIN.
-1.961606989	0.001525	um04629	ACETYL COA CARBOXYLASE (EC 6.4.1.2).

-1.966251846	0.0061219	um00374	ALLANTOATE PERMEASE.
-1.974093428	0.0125915	um02707	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.986657489	0.0076931	um01656	SUGAR TRANSPORTER STL1.
-2.051095963	0.0274217	um10175	SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE LYASE (EC 4.1.2.27).
-2.059746263	0.0004496	um10003	HYDROPHOBIC PROTEIN RCI2A (LOW TEMPERATURE AND SALT RESPONSIVE PROTEIN LTI6A).
-2.059870671	0.0015861	um04370	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN.
-2.176987491	0.0480669	um00202	BIFUNCTIONAL P-450:NADPH-P450 REDUCTASE PROTEIN (FATTY ACID OMEGA- HYDROXYLASE) (P450FOXY) [INCLUDES: CYTOCHROME P450 505 (EC 1.14.14.1); NADPH-CYTOCHROME P450 REDUCTASE (EC 1.6.2.4)].
-2.230730177	4.23E-07	um01055	GB AAD46013.1 (HYPOTHETICAL 59.1 KDA PROTEIN).
-2.232404901	5.03E-05	um11922	CHITIN DEACETYLASE PRECURSOR (EC 3.5.1.41).
-2.240842272	2.09E-05	um04190	NO ANNOTATION AVAILABLE
-2.276393132	0.0116007	um03847	NITRATE REDUCTASE [NADPH] (EC 1.6.6.3) (NR).
-2.290137673	0.0376582	um11403	HYPOTHETICAL 59.6 KDA PROTEIN IN COX14-HMGS INTERGENIC REGION.
-2.3044259	0.0190859	um11105	NITRATE TRANSPORTER.
-2.313642728	0.0027057	um02215	NITRILOTRIACETATE MONOOXYGENASE COMPONENT A (EC 1.14.13.).
-2.37286515	0.0227545	um10861	BERBERINE BRIDGE ENZYME (EC 1.5.3.9).
-2.404000537	0.0036331	um02984	DIBENZOTHIOPHENE DESULFURIZATION ENZYME C (DBT SULFUR DIOXYGENASE).
-2.490320806	0.0014632	um03995	ALPHA-KETOGLUTARATE-DEPENDENT TAURINE DIOXYGENASE (EC 1.14.11.17) (2-AMINOETHANESULFONATE DIOXYGENASE) (SULFATE STARVATION-INDUCED PROTEIN 3) (SSI3).
-2.511332893	0.0047471	um00455	MITOCHONDRIAL PHOSPHATE CARRIER PROTEIN (PHOSPHATE TRANSPORT PROTEIN) (PTP) (MITOCHONDRIAL IMPORT RECEPTOR) (P32).
-2.623648177	1.68E-05	um00158	POLYUNSATURATED FATTY ACID SPECIFIC ELONGATION ENZYME 1.
-2.657621426	0.0141649	um03485	P-COUMARIC ACID DECARBOXYLASE.
-2.790526583	9.48E-07	um00955	DELTA-9 FATTY ACID DESATURASE (EC 1.14.99.5).
-2.829947278	0.0110425	um11104	NITRITE REDUCTASE (EC 1.6.6.4).
-3.151603236	9.62E-05	um02300	AMYLASE (EC 3.2.1.-).
-3.319976474	0.0066479	um04577	UREA ACTIVE TRANSPORTER-LIKE PROTEIN.
-3.489660865	0.001978	um02796	ABC TRANSPORTER.
-3.555844372	0.0027837	um05038	POTASSIUM-TRANSPORTING ATPASE ALPHA CHAIN 2 (EC 3.6.3.10) (PROTON PUMP) (NON-GASTRIC H <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPASE ALPHA SUBUNIT).
-4.172649718	0.0052796	um06433	SODIUM/POTASSIUM-TRANSPORTING ATPASE ALPHA-4 CHAIN (EC 3.6.3.9) (SODIUM PUMP 4) (NA <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPASE 4) (FRAGMENT).
-4.226268657	0.0002391	um00573	K08H10.2A PROTEIN.

**Tabelle 10: Differenziell regulierte Gene nach zwei Stunden SG200 Glas vs. Parafilm +100µM 16-Hydroxypalmitinsäure**

log <sub>2</sub> Foldchange	P.Value	um Nummer	Annotation
3.141832071	0.001056	um03605	BETA-FRUCTOFURANOSIDASE 1 PRECURSOR (EC 3.2.1.26) (SUCROSE-6-PHOSPHATE HYDROLASE 1) (INVERTASE 1).
2.166126606	0.0016267	um02854	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.353238598	0.0020721	um10420	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.004499125	0.0011511	um04480	ALCOHOL DEHYDROGENASE (EC 1.1.1.1) (ADH-T).
-1.139873389	0.0018583	um01232	CYSTEINE PROTEINASE 1 (EC 3.4.22.40) (Y3) (BLEOMYCIN HYDROLASE) (BLM HYDROLASE).
-1.147679095	0.0023746	um11795	MICROSOMAL GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 3 (EC

			2.5.1.18) (MICROSOMAL GST- 3) (MICROSOMAL GST-III).
-1.153277402	0.0042727	um04145	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.158159672	0.0031794	um04484	CHOLINE-SULFATASE (EC 3.1.6.6).
-1.215176373	0.001432	um01017	HYPOTHETICAL 102.7 KDA PROTEIN IN PRP16-SRP40 INTERGENIC REGION.
-1.22740416	0.0022187	um02717	PUTATIVE TRANSCRIPTIONAL REGULATOR.
-1.243401995	0.0006683	um04897	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.284750937	0.0016042	um05766	PROBABLE SUPPRESSOR PROTEIN OF MITOCHONDRIAL HISTONE MUTANT.
-1.286753462	0.0004383	um04796	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN.
-1.306152226	0.0010778	um10062	related to monooxygenase
-1.339353707	0.0042168	um04171	HYPOTHETICAL 28.9 KDA PROTEIN IN CLN1-RAD14 INTERGENIC REGION.
-1.362222162	0.0016789	um01005	ATP CITRATE LYASE (ATP CITRATE LYASE, SUBUNIT 1) (EC 4.1.3.8).
-1.375459011	0.0028834	um11795	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.456635934	0.0025237	um03779	GALACTINOL SYNTHASE, ISOFORM GOLS-1 (EC 2.4.1.123).
-1.5180016	0.0034424	um04444	PEROXISOMAL INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN.
-1.596860348	0.0008766	um10905	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.597366099	0.0003461	um03994	PYRUVATE DECARBOXYLASE ISOZYME 1 (EC 4.1.1.1).
-1.620891275	0.0019809	um10474	MACROFAGE ACTIVATING GLYCOPROTEIN.
-1.696130333	0.0022747	um02161	PROTEIN KINASE C.
-1.726181081	0.0001279	um10062	FLAVIN-CONTAINING MONOOXYGENASE 3 (EC 1.14.13.8).
-1.746601976	0.0002991	um01888	CARBOXYPEPTIDASE CPDS PRECURSOR (EC 3.4.16.-).
-1.786366962	0.0009874	um06063	GLUTAMATE DECARBOXYLASE (EC 4.1.1.15).
-1.827961695	0.0006073	um10339	FATTY ACID SYNTHASE (EC 2.3.1.85) (CONTAINS: EC 2.3.1.38, EC 2.3.1.39, EC 2.3.1.41, EC 1.1.1.100, EC 4.2.1.60, EC 4.2.1.61, EC 1.3.1.10, AND EC 3.1.2.14).
-1.907775148	0.0027969	um02171	PARASITIC PHASE-SPECIFIC PROTEIN PSP-1.
-1.961606989	0.001525	um04629	ACETYL COA CARBOXYLASE (EC 6.4.1.2).
-2.059746263	0.0004496	um10003	HYDROPHOBIC PROTEIN RC12A (LOW TEMPERATURE AND SALT RESPONSIVE PROTEIN LTI6A).
-2.059870671	0.0015861	um04370	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN.
-2.230730177	4.23E-07	um01055	GBJ4AD46013.1 (HYPOTHETICAL 59.1 KDA PROTEIN).
-2.232404901	5.03E-05	um11922	CHITIN DEACETYLASE PRECURSOR (EC 3.5.1.41).
-2.240842272	2.09E-05	um04190	NO ANNOTATION AVAILABLE
-2.404000537	0.0036331	um02984	DIBENZOTHIOPHENE DESULFURIZATION ENZYME C (DBT SULFUR DIOXYGENASE).
-2.490320806	0.0014632	um03995	ALPHA-KETOGLUTARATE-DEPENDENT TAURINE DIOXYGENASE (EC 1.14.11.17) (2-AMINOETHANESULFONATE DIOXYGENASE) (SULFATE STARVATION-INDUCED PROTEIN 3) (SSI3).
-2.511332893	0.0047471	um00455	MITOCHONDRIAL PHOSPHATE CARRIER PROTEIN (PHOSPHATE TRANSPORT PROTEIN) (PTP) (MITOCHONDRIAL IMPORT RECEPTOR) (P32).
-2.623648177	1.68E-05	um00158	POLYUNSATURATED FATTY ACID SPECIFIC ELONGATION ENZYME 1.
-2.790526583	9.48E-07	um00955	DELTA-9 FATTY ACID DESATURASE (EC 1.14.99.5).
-3.151603236	9.62E-05	um02300	AMYLASE (EC 3.2.1.-).
-3.489660865	0.001978	um02796	ABC TRANSPORTER.

**Tabelle 11: Differentiell regulierte Gene nach vier Stunden SG200 Glas vs. Parafilm**

log <sub>2</sub> Foldchange	P.Value	um Nummer	Annotation
3.959072	8.39E-07	um11057	PEPTIDE TRANSPORTER MTD1.
3.641695	1.18E-06	um03024	SUBTILISIN-LIKE SERINE PROTEASE PR1C.
3.48502	2.11E-06	um01863	CYTOCHROME P450 94A1 (EC 1.14.-.-) (P450-DEPENDENT FATTY ACID OMEGA-HYDROXYLASE).
3.191146	0.0001455	um10881	GUANYL-SPECIFIC RIBONUCLEASE U1 (EC 3.1.27.3) (RNASE U1).
2.726209	9.33E-09	um03076	PUTATIVE 5' NUCLEOTIDASE FAMILY PROTEIN, POSSIBLY INVOLVED IN THE DEGRADATION OF EXTERNAL UDP-GLUCOSE BY SIMILARITY.
2.241038	0.0166368	um05104	NO ANNOTATION AVAILABLE
2.047284	0.0028138	um03924	REPELLENT PROTEIN.
2.009367	0.0003946	um00064	CATHEPSIN D PRECURSOR (EC 3.4.23.5).
2.00406	0.0326713	um02379	CPSY (PROBABLE UDP-GLUCOSE-4-EPIMERASE).
1.954891	1.56E-05	um04027	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.886796	0.0075601	um03585	VTPJ-THERM PROTEIN.
1.86524	7.38E-05	um01794	SECRETORY COMPONENT.
1.862279	0.0053337	um03117	PIMK PROTEIN.
1.732717	0.0395271	um02379	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.691846	0.0048513	um04379	P0512G09.14 PROTEIN (EST C97546(C60355) CORRESPONDS TO A REGION OF THE PREDICTED GENE).
1.691078	0.0003793	um02738	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.690748	0.0118399	um05704	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.685063	0.049981	um02803	BETA-1,3-GLUCAN BINDING PROTEIN.
1.634484	0.0034706	um01655	SECRETORY LIPASE 5 (EC 3.1.1.3).
1.624896	0.0003591	um05995	ACID PHOSPHATASE PRECURSOR (EC 3.1.3.2).
1.56611	0.020605	um00083	FORMATE/NITRITE FAMILY OF TRANSPORTERS.
1.54795	0.0310942	um11430	CHROMOSOME XII COSMID L3502.
1.538583	0.0151324	um02727	N,O-DIACETYLMURAMIDASE (EC 3.2.1.-) (LYSOZYME CH).
1.533144	0.0304287	um00891	XYLANASE/BETA-GLUCANASE PRECURSOR [INCLUDES: ENDO-1,4-BETA-XYLANASE (EC 3.2.1.8) (XYLANASE); ENDO-BETA-1,3-1,4 GLUCANASE (EC 3.2.1.73) (1,3-1,4-BETA-D-GLUCAN 4-GLUCANOHYDROLASE) (LICHENASE)].
1.532087	0.0008046	um02701	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.519864	0.000906	um05074	PHENYLACETATE HYDROXYLASE (EC 1.14.14.1).
1.513716	0.0208912	um02804	HYPOTHETICAL PROTEIN.
1.50526	0.0287176	um03116	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.500612	0.0032781	um06118	TRIPEPTIDYL-PEPTIDASE I PRECURSOR (EC 3.4.14.9) (TPP-I) (TRIPEPTIDYL AMINOPEPTIDASE) (LYSOSOMAL PEPSTATIN INSENSITIVE PROTEASE) (LPIC).
1.445466	0.0011421	um01812	LYSOSOMAL ACID PHOSPHATASE PRECURSOR (EC 3.1.3.2) (LAP).
1.425815	0.0054474	um04130	DIK6.
1.419281	0.0114806	um03065	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.374947	0.0014422	um01117	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.322453	0.0010258	um05813	PUTATIVE TRANSMEMBRANE PROTEIN.
1.313407	0.0076596	um04247	BILE-SALT-ACTIVATED LIPASE PRECURSOR (EC 3.1.1.3) (EC 3.1.1.13) (BAL) (BILE-SALT-STIMULATED LIPASE) (BSSL) (CARBOXYL ESTER LIPASE) (STEROL ESTERASE) (CHOLESTEROL ESTERASE) (PANCREATIC LYSOPHOSPHOLIPASE).

1.312981	0.0009884	um04378	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.301926	9.08E-05	um10068	ACID PHOSPHATASE PRECURSOR (EC 3.1.3.2) (PH 6-OPTIMUM ACID PHOSPHATASE) (APASE6).
1.295038	0.0067198	um00096	ROOT IRON TRANSPORTER PROTEIN.
1.24358	0.0042552	um04378	ALDEHYDE DEHYDROGENASE, E3 ISOZYME (EC 1.2.1.3) (GAMMA- AMINOBUTYRALDEHYDE DEHYDROGENASE) (EC 1.2.1.19) (R-AMINOBUTYRALDEHYDE DEHYDROGENASE).
1.24057	0.005494	um05046	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.233804	0.0006539	um11152	2-AMINO-3-CARBOXYMUCONATE-6-SEMIALDEHYDE DECARBOXYLASE (EC 4.1.1.45).
1.224053	0.0029829	um05414	DHA14-LIKE MAJOR FACILITATOR.
1.195565	0.0036897	um01725	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.175453	0.0257244	um00330	CHROMOSOME XII COSMID 8167.
1.160307	0.0009015	um00800	MFS INORGANIC PHOSPHATE TRANSPORTER.
1.159427	0.0016475	um01758	MGATP-ENERGIZED GLUTATHIONE S-CONJUGATE PUMP (EC 3.6.1.3).
1.146408	0.000472	um01786	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.117917	0.0019926	um04533	MITOMYCIN RADICAL OXIDASE (EC 1.5.3.-).
1.111807	0.0036163	um10053	CARBONIC ANHYDRASE (EC 4.2.1.1).
1.090025	0.0035919	um05633	PUTATIVE TRANSMEMBRANE PROTEIN.
1.089625	0.0322608	um00132	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.061706	0.0101016	um01699	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN.
1.053616	0.0344765	um00465	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.050638	0.0102109	um04482	RELATED TO HOST-SPECIFIC AK-TOXIN AKT2.
1.026305	0.0482924	um00157	PYRUVATE KINASE (EC 2.7.1.40) (PK).
1.019432	0.0338344	um11505	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.011996	0.0277092	um03651	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.007048	0.0100091	um01136	T10F20.2 PROTEIN (T10F20.1 PROTEIN) (AT1G18010/T10F20_2).
1.005573	0.0033056	um01976	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.04783	0.001317	um06492	(NC_001139) Nicotinamide/nicotinic acid mononucleotide
-1.17726	0.0429217	um10605	ALCOHOL DEHYDROGENASE II (EC 1.1.1.1) (ADH 1).
-1.20479	0.0274047	um10657	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.31028	0.0324933	um03568	REGULATORY PROTEIN ALCR.
-1.37029	0.0073221	um10717	PHTHALATE TRANSPORTER.
-1.73729	0.0004146	um02683	HYPOTHETICAL 34.5 KDA PROTEIN (L-GALACTOSE DEHYDROGENASE) (AT4G33670/T16L1_160).
-1.79746	5.11E-05	um10815	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.80384	0.0056941	um10242	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.87056	0.0475083	um02877	NO ANNOTATION AVAILABLE
-2.08679	0.0291118	um04910	NO ANNOTATION AVAILABLE
-2.17592	0.0481672	um00202	BIFUNCTIONAL P-450:NADPH-P450 REDUCTASE PROTEIN (FATTY ACID OMEGA- HYDROXYLASE) (P450FOXY) [INCLUDES: CYTOCHROME P450 505 (EC 1.14.14.1); NADPH-CYTOCHROME P450 REDUCTASE (EC 1.6.2.4)].
-2.195	0.0104308	um05791	CYTOCHROME P450 67 (EC 1.14.-.-) (CYPLXVII) (PLANTA-INDUCED RUST PROTEIN 16) (FRAGMENT).
-2.21531	0.048404	um00336	NO ANNOTATION AVAILABLE
-2.42542	0.0143215	um10676	HYPOTHETICAL PROTEIN MA1996.
-2.45779	0.0218979	um02796	ABC TRANSPORTER.
-3.26173	0.0074973	um00082	NO ANNOTATION AVAILABLE



**Tabelle 12: Differentiell regulierte Gene nach vier Stunden SG200 Glas vs. Parafilm +100µM 16-Hydroxypalmitinsäure**

log <sub>2</sub> Foldchange	P.Value	um Nummer	Annotation
4.320081	7.65E-08	um03024	SUBTILISIN-LIKE SERINE PROTEASE PR1C.
3.925095	9.57E-07	um11057	PEPTIDE TRANSPORTER MTD1.
3.638568	1.10E-06	um01863	CYTOCHROME P450 94A1 (EC 1.14.-.-) (P450-DEPENDENT FATTY ACID OMEGA-HYDROXYLASE).
3.121159	0.000186	um10881	GUANYL-SPECIFIC RIBONUCLEASE U1 (EC 3.1.27.3) (RNASE U1).
2.907764	0.002773	um05104	NO ANNOTATION AVAILABLE
2.862985	8.39E-06	um01655	SECRETORY LIPASE 5 (EC 3.1.1.3).
2.83007	0.000252	um02222	DIK6.
2.736392	0.001941	um01957	CLASS I ALPHA-MANNOSIDASE 1B (EC 3.2.1.113).
2.678379	1.28E-08	um03076	PUTATIVE 5' NUCLEOTIDASE FAMILY PROTEIN, POSSIBLY INVOLVED IN THE DEGRADATION OF EXTERNAL UDP-GLUCOSE BY SIMILARITY.
2.529506	2.76E-05	um00064	CATHEPSIN D PRECURSOR (EC 3.4.23.5).
2.472359	0.000262	um00411	METALLOPROTEASE MEP1.
2.442658	5.44E-05	um01698	GLUCOAMYLASE S1/S2 PRECURSOR (EC 3.2.1.3) (GLUCAN 1,4-ALPHA- GLUCOSIDASE) (1,4-ALPHA-D-GLUCAN GLUCOHYDROLASE).
2.406069	0.00047	um03196	NO ANNOTATION AVAILABLE
2.404306	1.27E-06	um01725	NO ANNOTATION AVAILABLE
2.305076	6.63E-06	um02701	NO ANNOTATION AVAILABLE
2.254698	0.000229	um03065	NO ANNOTATION AVAILABLE
2.242505	7.27E-05	um04130	DIK6.
2.165137	0.003477	um00891	XYLANASE/BETA-GLUCANASE PRECURSOR [INCLUDES: ENDO-1,4-BETA-XYLANASE (EC 3.2.1.8) (XYLANASE); ENDO-BETA-1,3-1,4 GLUCANASE (EC 3.2.1.73) (1,3-1,4-BETA-D-GLUCAN 4-GLUCANOHYDROLASE) (LICHENASE)].
2.110249	0.002858	um11658	NO ANNOTATION AVAILABLE
2.075151	0.000379	um03535	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.996915	1.17E-05	um04027	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.929757	0.004706	um01025	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.928326	0.003871	um00644	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.898491	0.002543	um03586	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.892043	0.000213	um03651	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.884133	0.003666	um02752	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.864232	4.86E-06	um04349	ESTERASE (EC 3.1.1.1).
1.857935	0.002099	um04364	EXO-1,3-BETA-GLUCANASE PRECURSOR (EC 3.2.1.58).
1.85123	8.07E-05	um01794	SECRETORY COMPONENT.
1.84661	0.000146	um02738	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.775241	0.001218	um00738	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.754842	0.000121	um01117	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.724003	0.003703	um02223	ACID PHOSPHATASE.
1.717351	0.002011	um00330	CHROMOSOME XII COSMID 8167.
1.715531	5.60E-05	um04378	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.700892	0.000962	um04247	BILE-SALT-ACTIVATED LIPASE PRECURSOR (EC 3.1.1.3) (EC 3.1.1.13) (BAL) (BILE-SALT-STIMULATED LIPASE) (BSSL) (CARBOXYL ESTER LIPASE) (STEROL ESTERASE) (CHOLESTEROL ESTERASE) (PANCREATIC LYSOPHOSPHOLIPASE).
1.618962	0.002282	um00970	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.601925	0.000719	um04512	CHAPERONE PROTEIN DNAJ.
1.600358	0.000461	um04378	ALDEHYDE DEHYDROGENASE, E3 ISOZYME (EC 1.2.1.3) (GAMMA- AMINOBUTYRALDEHYDE DEHYDROGENASE) (EC 1.2.1.19) (R-AMINOBUTYRALDEHYDE

			DEHYDROGENASE).
1.596055	0.003416	um03808	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.587478	0.000596	um05074	PHENYLACETATE HYDROXYLASE (EC 1.14.14.1).
1.53621	0.003197	um02812	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.520922	0.001446	um00891	XYLANASE/BETA-GLUCANASE PRECURSOR [INCLUDES: ENDO-1,4-BETA-XYLANASE (EC 3.2.1.8) (XYLANASE); ENDO-BETA-1,3-1,4 GLUCANASE (EC 3.2.1.73) (1,3-1,4-BETA-D-GLUCAN 4-GLUCANOHYDROLASE) (LICHENASE)].
1.479014	0.001653	um06133	GLUCAN 1,3 BETA-GLUCOSIDASE-LIKE PROTEIN (FRAGMENT).
1.451535	0.000319	um00225	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.442589	0.000163	um04533	MITOMYCIN RADICAL OXIDASE (EC 1.5.3.-).
1.416304	0.002703	um11063	LD32366P.
1.412418	0.000532	um10886	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.405903	0.002423	um05819	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.397376	0.003381	um00876	EXO-1,3-BETA-GLUCANASE PRECURSOR (EC 3.2.1.58).
1.396964	0.002178	um05046	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.38672	0.002433	um11009	DNA MISMATCH REPAIR PROTEIN MSH6.
1.376708	0.001391	um01699	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN.
1.361125	0.000928	um05344	PEPTIDOGLYCAN BINDING DOMAIN PROTEIN.
1.352792	0.004504	um01694	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.331539	0.003136	um05783	EG:100G10.5 PROTEIN (UDP-GALACTOSE TRANSPORTER) (CMP-SIALIC ACID/UDP-GALACTOSE TRANSPORTER).
1.316333	0.00043	um11044	PEPTIDE-N4-(N-ACETYL-BETA-D-GLUCOSAMINYL) ASPARAGINASE AMIDASE N.
1.310427	0.001587	um02557	DNA POLYMERASE ALPHA (EC 2.7.7.7).
1.300451	0.003298	um06125	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.296582	0.000472	um04987	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.291287	0.003197	um03694	PUTATIVE STERIGMATOCYSTIN BIOSYNTHESIS PEROXIDASE STCC PRECURSOR (EC 1.11.-.-).
1.269548	0.000404	um10207	ACETAMIDASE (EC 3.5.1.4).
1.268665	0.001152	um03792	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.261317	0.002492	um04070	RHO3 GTP BINDING PROTEIN.
1.259398	0.001055	um05633	PUTATIVE TRANSMEMBRANE PROTEIN.
1.238515	0.002	um05960	OXIDOREDUCTASE.
1.22031	0.004453	um01008	DNA POLYMERASE EPSILON, CATALYTIC SUBUNIT A (EC 2.7.7.7) (DNA POLYMERASE II SUBUNIT A).
1.219991	0.003363	um10008	INDIGOIDINE SYSTHESIS PROTEIN IDGA.
1.206128	0.003801	um01785	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.204722	0.0011	um03947	CARBOXYPEPTIDASE S1 PRECURSOR (EC 3.4.16.6).
1.195753	0.000199	um11034	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.186387	0.000814	um02159	UNCOORDINATED PROTEIN 47 (PROTEIN UNC-47).
1.167388	0.004718	um06497	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.165531	0.002292	um11596	CHROMOSOME XII COSMID L3502.
1.158029	0.004578	um05414	DHA14-LIKE MAJOR FACILITATOR.
1.146453	0.001067	um11010	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.141227	0.002944	um10053	CARBONIC ANHYDRASE (EC 4.2.1.1).
1.134649	0.001449	um00386	PUTATIVE GTP CYCLOHYDROLASE, RIBOFLAVIN BIOSYNTHESIS.
1.130598	0.000923	um04470	1,4-ALPHA-GLUCAN BRANCHING ENZYME (EC 2.4.1.18) (GLYCOGEN BRANCHING ENZYME) (BRANCHER ENZYME).
1.125488	0.003845	um10752	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.123539	0.003406	um03520	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.107742	0.003316	um02556	NO ANNOTATION AVAILABLE

1.107181	0.000584	um02206	HYPOTHETICAL 66.9 KDA PROTEIN.
1.08747	0.002154	um02163	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.085973	0.000337	um02410	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.084117	0.002137	um00711	AUTOANTIGEN.
1.077372	0.004204	um05346	T10F20.2 PROTEIN (T10F20.1 PROTEIN) (AT1G18010/T10F20_2).
1.072166	0.002825	um10101	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.068838	0.002008	um01976	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.059693	0.001508	um04851	MEROZOITE CAPPING PROTEIN-1 (FRAGMENT).
1.058173	0.001536	um01919	CYTIDINE DEAMINASE (EC 3.5.4.5) (CYTIDINE AMINOHYDROLASE) (CDA).
1.05492	0.002534	um02146	GABA PERMEASE.
1.048858	0.004069	um03221	OXIDOREDUCTASE.
1.047028	0.00221	um05700	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.046351	0.002148	um02951	DRUG RESISTANCE PROTEIN MDRA.
1.045964	0.00226	um00800	MFS INORGANIC PHOSPHATE TRANSPORTER.
1.043278	0.00294	um02095	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.04156	0.001184	um01786	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.037082	0.002888	um05759	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.027863	0.003117	um04580	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.022953	0.003119	um10454	4-COUMARATE:COA LIGASE (EC 6.2.1.12).
1.019612	0.00374	um11199	SERINE/THREONINE PROTEIN KINASE PITSLRE (EC 2.7.1.37) (CELL DIVISION CYCLE 2-LIKE).
1.018777	0.001085	um01219	HYPOTHETICAL 32.0 KDA PROTEIN C2A9.07C IN CHROMOSOME II.
1.004587	0.003823	um00050	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.1825	0.002886	um03551	GLUCOSE OXIDASE PRECURSOR (EC 1.1.3.4) (GLUCOSE OXYHYDRASE) (GOD) (BETA-D-GLUCOSE:OXYGEN 1- OXIDO-REDUCTASE).
-1.25904	0.002031	um10815	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.36977	0.000165	um01835	CARNITINE ACETYL TRANSFERASE FACC.
-1.46359	0.002485	um02642	NITROREDUCTASE FAMILY PROTEIN.
-1.49423	0.004053	um10681	KETOL-ACID REDUCTOISOMERASE, MITOCHONDRIAL PRECURSOR (EC 1.1.1.86) (ACETOHYDROXY-ACID REDUCTOISOMERASE) (ALPHA-KETO-BETA- HYDROXYLACIL REDUCTOISOMERASE).
-1.57246	0.004042	um03177	PEROXISOMAL MEMBRANE PROTEIN PMP20.
-1.59571	0.001897	um11345	S-ADENOSYLMETHIONINE-DEPENDENT METHYLTRANSFERASE.
-1.71683	0.003479	um04922	ALDO-KETO REDUCTASE FAMILY 1 MEMBER C4 (EC 1.1.1.-) (CHLORDECON REDUCTASE) (EC 1.1.1.225) (CDR) (3-ALPHA-HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE) (EC 1.1.1.50) (3-ALPHA-HSD) (DIHYDRODIOL DEHYDROGENASE 4) (DD4) (HAKRA).
-1.79074	0.002128	um10215	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.81408	0.002861	um04492	PUTATIVE TRANSCRIPTIONAL ACTIVATOR.
-1.84002	0.003259	um00123	CYTOCHROME B2, MITOCHONDRIAL PRECURSOR (EC 1.1.2.3) (L-LACTATE DEHYDROGENASE [CYTOCHROME]) (L-LACTATE FERRICYTOCHROME C OXIDOREDUCTASE) (L-LCR).
-1.84811	3.16E-05	um10682	CYTOCHROME B2, MITOCHONDRIAL PRECURSOR (EC 1.1.2.3) (L-LACTATE DEHYDROGENASE [CYTOCHROME]) (L-LACTATE FERRICYTOCHROME C OXIDOREDUCTASE) (L-LCR).
-1.90028	0.000918	um05056	HYPOTHETICAL 13.8 KDA PROTEIN IN PWP2-SUP61 INTERGENIC REGION.
-2.16604	0.001313	um05393	MULTIDRUG RESISTANT PROTEIN.
-2.17183	0.002235	um11895	NO ANNOTATION AVAILABLE
-2.33715	0.000638	um10242	NO ANNOTATION AVAILABLE
-2.60659	0.004809	um01187	UNIVERSAL STRESS PROTEIN USPA AND RELATED NUCLEOTIDE-BINDING PROTEINS.

-2.92698	0.001497	um02190	NO ANNOTATION AVAILABLE
-3.43882	0.003663	um00336	NO ANNOTATION AVAILABLE

**Tabelle 13: Differentiell regulierte Gene nach acht Stunden SG200 Glas vs. Parafilm**

log <sub>2</sub> Foldchange	P.Value	um Nummer	Annotation
3.376152	7.56E-05	um10881	GUANYL-SPECIFIC RIBONUCLEASE U1 (EC 3.1.27.3) (RNASE U1).
3.099885	1.11E-05	um01863	CYTOCHROME P450 94A1 (EC 1.14.-.-) (P450-DEPENDENT FATTY ACID OMEGA-HYDROXYLASE).
2.887099	8.26E-05	um04354	NO ANNOTATION AVAILABLE
2.690399	0.003903	um03605	BETA-FRUCTOFURANOSIDASE 1 PRECURSOR (EC 3.2.1.26) (SUCROSE-6-PHOSPHATE HYDROLASE 1) (INVERTASE 1).
2.553739	0.000134	um10281	EXTRACELLULAR ASPARTIC PROTEINASE PRECURSOR (EC 3.4.23.21).
2.534184	0.001025	um11430	CHROMOSOME XII COSMID L3502.
2.482951	0.009806	um02379	CPSY (PROBABLE UDP-GLUCOSE-4-EPIMERASE).
2.404886	0.005976	um02379	NO ANNOTATION AVAILABLE
2.259202	0.001331	um05704	NO ANNOTATION AVAILABLE
2.227652	0.01824	um00029	MYO-INOSITOL OXYGENASE (EC 1.13.99.1).
2.145445	0.004296	um04410	probable siderophore iron transporter mirC
2.076147	0.006754	um06190	ENDOCHITINASE.
2.059467	0.000585	um03065	NO ANNOTATION AVAILABLE
2.038053	0.003093	um01025	NO ANNOTATION AVAILABLE
2.013036	0.002944	um03117	PINK PROTEIN.
1.953127	0.005047	um00083	FORMATE/NITRITE FAMILY OF TRANSPORTERS.
1.928726	0.022622	um06391	MFS MULTIDRUG EFFLUX TRANSPORTER (FRAGMENT).
1.872917	0.021035	um01422	LIPASE B PRECURSOR (EC 3.1.1.3) (CALB).
1.853834	0.000134	um05046	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.815692	0.005191	um02901	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.717773	7.93E-05	um04027	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.658242	0.010218	um11057	PEPTIDE TRANSPORTER MTD1.
1.654822	0.003149	um01655	SECRETORY LIPASE 5 (EC 3.1.1.3).
1.642214	0.006847	um04353	N-ACETYLGLUCOSAMINYLTRANSFERASE (EC 2.4.1.-).
1.606826	0.000369	um03795	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.577428	0.00109	um05227	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.562961	0.025495	um02222	DIK6.
1.551297	0.0154	um10636	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.541965	0.022474	um01694	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.518774	0.001083	um02738	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.51272	0.003492	um04130	DIK6.
1.467671	0.010507	um00303	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.452509	0.001081	um01073	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.432173	0.006466	um02157	FAD dependent oxidoreductase, putative
1.420169	0.006859	um00132	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.41143	0.020767	um05631	PEBBLE (PBL PROTEIN) (CG8114 PROTEIN).
1.403559	0.022197	um04949	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.379227	0.019985	um04791	G1/S-SPECIFIC CYCLIN CLN1.
1.37658	0.001124	um01725	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.371512	0.000208	um03076	PUTATIVE 5 NUCLEOTIDASE FAMILY PROTEIN, POSSIBLY INVOLVED IN THE DEGRADATION OF EXTERNAL UDP-GLUCOSE BY SIMILARITY.
1.36383	0.040201	um04403	MUCIN.

1.357181	0.002336	um06125	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.354727	0.020044	um01788	DEACETYLASE PRECURSOR.
1.354613	0.011299	um04224	MYOSIN-LIKE PROTEIN NUF2 (NUCLEAR FILAMENT-CONTAINING PROTEIN 2) (NUCLEAR DIVISION PROTEIN NUF2).
1.321838	0.000667	um05633	PUTATIVE TRANSMEMBRANE PROTEIN.
1.317345	0.017199	um10000	IMMUNOREACTIVE 87KD ANTIGEN PG92.
1.311076	0.000572	um01182	NUCLEAR AND CYTOPLASMIC POLYADENYLATED RNA-BINDING PROTEIN PUB1 (ARS CONSENSUS BINDING PROTEIN ACBP-60) (POLY(U)-BINDING PROTEIN) (POLY URIDYLATE-BINDING PROTEIN).
1.289293	0.038335	um05689	HYPOTHETICAL PROTEIN FLJ14497 (P53-RESPONSIVE GENE 3).
1.275624	0.001422	um05813	PUTATIVE TRANSMEMBRANE PROTEIN.
1.273408	0.0006	um11044	PEPTIDE-N4-(N-ACETYL-BETA-D-GLUCOSAMINYL) ASPARAGINASE AMIDASE N.
1.266992	0.01711	um00330	CHROMOSOME XII COSMID 8167.
1.212648	0.043733	um05528	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN.
1.21157	0.042988	um01281	SUC1-SUCROSE PROTON SYMPORTER.
1.207051	0.005509	um03615	CHOLINE DEHYDROGENASE (EC 1.1.99.1).
1.206453	0.011613	um11712	CONDENSIN COMPLEX SUBUNIT 1 (P128).
1.202019	0.011599	um03011	PREDICTED METAL-DEPENDENT HYDROLASE WITH THE TIM-BARREL FOLD.
1.188747	0.032127	um11155	HYPOTHETICAL 111.8 KDA PROTEIN.
1.177615	0.026902	um00132	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.172836	0.027145	um02259	HYPOTHETICAL 159.0 KDA PROTEIN.
1.169861	0.009063	um04512	CHAPERONE PROTEIN DNAJ.
1.169268	0.022025	um10114	40S RIBOSOMAL PROTEIN S16.
1.16817	0.015937	um03987	CONDENSIN COMPLEX SUBUNIT 2 (P105).
1.158766	0.020736	um02690	CELL WALL SURFACE ANCHOR FAMILY PROTEIN.
1.158366	0.010374	um06133	GLUCAN 1,3 BETA-GLUCOSIDASE-LIKE PROTEIN (FRAGMENT).
1.157356	0.027098	um12127	hypothetical protein
1.153556	0.004089	um00192	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.152321	0.004626	um10414	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.136531	0.022438	um04393	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.126981	0.016517	um11315	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.124831	0.030108	um02758	CHITINASE A PRECURSOR (EC 3.2.1.14).
1.122443	0.045843	um10120	CHITIN SYNTHASE 1 (EC 2.4.1.16) (CHITIN-UDP ACETYL-GLUCOSAMINYL TRANSFERASE 1).
1.119061	0.003327	um05959	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.111627	0.01899	um04727	MITOTIC KINESIN-LIKE PROTEIN-1 (KINESIN-LIKE PROTEIN 5).
1.111258	0.045291	um11592	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.106938	0.013785	um02243	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.091347	0.015239	um00366	DNA REPLICATION LICENSING FACTOR MIS5.
1.087363	0.024513	um11505	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.082645	0.010473	um02741	SERINE/THREONINE-PROTEIN KINASE ORB6 (EC 2.7.1.37).
1.077772	0.047162	um01755	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.070411	0.008789	um02261	RIBOFLAVIN ALDEHYDE-FORMING ENZYME (FRAGMENT).
1.06517	0.01916	um02430	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.064804	0.008737	um03740	ANDROGEN-INDUCED PROSTATE PROLIFERATIVE SHUTOFF ASSOCIATED PROTEIN.
1.064105	0.00128	um04999	EXTENSIN CLASS II PRECURSOR (CELL WALL HYDROXYPROLINE-RICH GLYCOPROTEIN) (HRGP) (TOML-4).
1.053434	0.033633	um10419	CHITINASE.

1.048544	0.049702	um03776	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.045957	0.029073	um04247	BILE-SALT-ACTIVATED LIPASE PRECURSOR (EC 3.1.1.3) (EC 3.1.1.13) (BAL) (BILE-SALT-STIMULATED LIPASE) (BSSL) (CARBOXYL ESTER LIPASE) (STEROL ESTERASE) (CHOLESTEROL ESTERASE) (PANCREATIC LYSOPHOSPHOLIPASE).
1.044959	0.029764	um04414	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.044393	0.034386	um10474	MACROFAGE ACTIVATING GLYCOPROTEIN.
1.042109	0.001396	um11253	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.042015	0.00095	um11016	rec1 U. maydis
1.036851	0.041872	um00738	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.028254	0.002767	um01976	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.022299	0.03541	um01647	WD-REPEAT CONTAINING PROTEIN SLP1.
1.021847	0.005391	um01868	METABOLITE TRANSPORT PROTEIN.
1.013057	0.023047	um02640	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.005608	0.041606	um02392	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.004127	0.008267	um01042	FORKHEAD PROTEIN SEP1.
1.004062	0.017968	um00141	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.00075	0.026777	um02317	COPROPORPHYRINOGEN III OXIDASE (EC 1.3.3.3) (COPROPORPHYRINOGENASE) (COPROGEN OXIDASE) (COX).
-1.01236	0.043751	um11549	LIPIC ACID SYNTHETASE, MITOCHONDRIAL PRECURSOR (LIP-SYN) (LIPOATE SYNTHASE).
-1.02072	0.005778	um01017	HYPOTHETICAL 102.7 KDA PROTEIN IN PRP16-SRP40 INTERGENIC REGION.
-1.02097	0.042966	um04576	MOLECULAR CHAPERONE MRJ.
-1.04511	0.041745	um10208	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.06522	0.041746	um02161	PROTEIN KINASE C.
-1.06552	0.02139	um05226	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.0762	0.0465	um10657	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.07733	0.001771	um01835	CARNITINE ACETYL TRANSFERASE FACC.
-1.08053	0.046288	um10240	GLUTARYL-COA DEHYDROGENASE, MITOCHONDRIAL PRECURSOR (EC 1.3.99.7) (GCD).
-1.08145	0.038871	um11808	CHROMOSOME XII COSMID 8479.
-1.08165	0.021047	um04251	CG11679 PROTEIN (GM02445P).
-1.0898	0.008342	um05037	GLYOXYLATE REDUCTASE (EC 1.1.1.79) (GLYOXYLATE REDUCTASE/HYDROXYPYRUVATE REDUCTASE).
-1.10382	0.035401	um01885	FATTY ACID SYNTHASE (EC 2.3.1.85) [INCLUDES: EC 2.3.1.38; EC 2.3.1.39; EC 2.3.1.41; EC 1.1.1.100; EC 4.2.1.61; EC 1.3.1.10; EC 3.1.2.14].
-1.11214	0.022562	um11345	S-ADENOSYLMETHIONINE-DEPENDENT METHYLTRANSFERASE.
-1.12464	0.031078	um11598	ALDO-KETO REDUCTASE FAMILY 1 MEMBER C4 (EC 1.1.1.-) (CHLORDEKONE REDUCTASE) (EC 1.1.1.225) (CDR) (3-ALPHA-HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE) (EC 1.1.1.50) (3-ALPHA-HSD) (DIHYDRODIOL DEHYDROGENASE 4) (DD4) (HAKRA).
-1.13021	0.04352	um03139	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.13668	0.041145	um04217	HYPOTHETICAL PROTEIN NMB1951.
-1.14399	0.022308	um10188	L-ORNITHINE 5-MONOOXYGENASE (EC 1.13.12.-) (L-ORNITHINE N5-OXYGENASE).
-1.1468	0.005623	um10062	FLAVIN-CONTAINING MONOOXYGENASE 3 (EC 1.14.13.8).
-1.15421	0.00376	um10682	CYTOCHROME B2, MITOCHONDRIAL PRECURSOR (EC 1.1.2.3) (L-LACTATE DEHYDROGENASE [CYTOCHROME]) (L-LACTATE FERRICYTOCHROME C OXIDOREDUCTASE) (L-LCR).
-1.15984	0.047366	um11440	WD REPEAT PROTIEIN.
-1.18729	0.016688	um02282	F6A14.17 PROTEIN (AT1G18720/F6A14_17).
-1.19938	0.032922	um04500	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.22676	0.020221	um04873	3-ISOPROPYLMALATE DEHYDROGENASE (EC 1.1.1.85) (BETA-IPM DEHYDROGENASE) (IMDH) (3-IPM-DH).

-1.23563	0.038745	um00167	SULFOLIPID SULFOQUINOVOSYLDIACYLGLYCEROL BIOSYNTHESIS PROTEIN.
-1.23748	0.00306	um03440	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.26015	0.032576	um04630	MUS81 ENDONUCLEASE.
-1.28111	0.0092	um02876	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.28615	0.019795	um04189	BIFUNCTIONAL P-450:NADPH-P450 REDUCTASE PROTEIN (FATTY ACID OMEGA- HYDROXYLASE) (P450FOXY) [INCLUDES: CYTOCHROME P450 505 (EC 1.14.14.1); NADPH-CYTOCHROME P450 REDUCTASE (EC 1.6.2.4)].
-1.2941	0.039084	um10242	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.32806	0.026228	um05600	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.33156	0.001245	um10815	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.33904	0.003718	um02492	SYRINGOMYCIN BIOSYNTHESIS ENZYME-LIKE PROTEIN.
-1.3445	0.004568	um05103	ATP SULPHURYLASE (EC 2.7.7.4).
-1.36465	0.011439	um04268	SACCHAROPINE DEHYDROGENASE [NAD <sup>+</sup> , L-LYSINE FORMING] (EC 1.5.1.7) (LYSINE--2-OXOGLUTARATE REDUCTASE) (SDH).
-1.37465	0.000959	um03440	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.38148	0.008985	um00158	POLYUNSATURATED FATTY ACID SPECIFIC ELONGATION ENZYME 1.
-1.38449	0.011384	um10003	HYDROPHOBIC PROTEIN RCI2A (LOW TEMPERATURE AND SALT RESPONSIVE PROTEIN LTI6A).
-1.39402	0.000579	um10062	related to monooxygenase
-1.46231	0.038665	um03023	RIBONUCLEASE T2 PRECURSOR (EC 3.1.27.1) (RNASE T2).
-1.50609	0.015947	um01899	MULTIDRUG RESISTANT PROTEIN.
-1.53083	0.004941	um03177	PEROXISOMAL MEMBRANE PROTEIN PMP20.
-1.56137	0.006585	um01313	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.56872	0.003948	um11919	MALOLACTIC ENZYME, MITOCHONDRIAL PRECURSOR (EC 1.-.-.-) (MLE) [INCLUDES: MALIC ENZYME (EC 1.1.1.-); L-LACTATE DEHYDROGENASE (EC 1.1.1.27)].
-1.57164	0.013098	um05204	PHOSPHATASE, ORPHAN 1.
-1.6351	0.011828	um00723	RELATED TO STRESS RESPONSE PROTEIN RDS1P.
-1.64216	0.022033	um02300	AMYLASE (EC 3.2.1.-).
-1.68566	0.013045	um01951	RIBOSOMAL-PROTEIN-SERINE ACETYLTRANSFERASE (EC 2.3.1.-).
-1.72986	0.03604	um01773	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.77837	0.004016	um03006	ALDO/KETO REDUCTASE.
-1.80381	0.00433	um02171	PARASITIC PHASE-SPECIFIC PROTEIN PSP-1.
-1.97194	0.004779	um11895	NO ANNOTATION AVAILABLE
-2.00438	0.020831	um02774	ALTERNATIVE OXIDASE, MITOCHONDRIAL PRECURSOR (EC 1.-.-.-).
-2.0095	0.040819	um00529	CARBOXYLIC ACID TRANSPORT PROTEIN.
-2.24661	0.006155	um02865	NO ANNOTATION AVAILABLE
-2.3593	0.007971	um02190	NO ANNOTATION AVAILABLE
-2.40695	0.016371	um12026	related to TMT1 - trans-aconitate methyltransferase (N-terminal fragment)
-2.45072	0.008424	um03881	HSP30.
-2.68752	0.005624	um00496	MISMATCHED BASE PAIR AND CRUCIFORM DNA RECOGNITION PROTEIN (FRAGMENT).
-2.73469	0.021909	um00082	NO ANNOTATION AVAILABLE
-2.8775	0.007032	um00573	K08H10.2A PROTEIN.
-2.93139	0.00519	um05170	NAD-DEPENDENT FORMATE DEHYDROGENASE (EC 1.2.1.2).
-3.02475	0.002066	um10175	SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE LYASE (EC 4.1.2.27).
-3.44643	0.003601	um00336	NO ANNOTATION AVAILABLE
-3.45397	0.032949	um03169	ORNITHINE AMINOTRANSFERASE (EC 2.6.1.13).

**Tabelle 14: Differentiell regulierte Gene nach acht Stunden SG200 Glas vs. Parafilm +100µM 16-Hydroxypalmitinsäure**

log <sub>2</sub> Foldchange	P.Value	um Nummer	Annotation
3.989978	8.85E-06	um10881	GUANYL-SPECIFIC RIBONUCLEASE U1 (EC 3.1.27.3) (RNASE U1).
3.721872	7.78E-07	um01863	CYTOCHROME P450 94A1 (EC 1.14.-.-) (P450-DEPENDENT FATTY ACID OMEGA-HYDROXYLASE).
3.605188	4.54E-06	um04354	NO ANNOTATION AVAILABLE
3.400318	0.045985	um05979	NO ANNOTATION AVAILABLE
3.153405	0.000105	um11430	CHROMOSOME XII COSMID L3502.
2.967926	9.65E-05	um00083	FORMATE/NITRITE FAMILY OF TRANSPORTERS.
2.889635	0.001376	um02379	NO ANNOTATION AVAILABLE
2.887227	0.000614	um04928	HOMEOPROTEIN.
2.758762	2.05E-05	um03065	NO ANNOTATION AVAILABLE
2.727623	0.003509	um03605	BETA-FRUCTOFURANOSIDASE 1 PRECURSOR (EC 3.2.1.26) (SUCROSE-6-PHOSPHATE HYDROLASE 1) (INVERTASE 1).
2.638848	9.17E-05	um10281	EXTRACELLULAR ASPARTIC PROTEINASE PRECURSOR (EC 3.4.23.21).
2.634563	0.006579	um02379	CPSY (PROBABLE UDP-GLUCOSE-4-EPIMERASE).
2.603843	0.000336	um05704	NO ANNOTATION AVAILABLE
2.484337	0.000526	um01025	NO ANNOTATION AVAILABLE
2.38145	0.006144	um06391	MFS MULTIDRUG EFFLUX TRANSPORTER (FRAGMENT).
2.37632	0.001889	um04410	probable siderophore iron transporter mirC
2.353359	0.000212	um03558	HYPOTHETICAL 111.8 KDA PROTEIN.
2.301771	0.001852	um02222	DIK6.
2.292997	9.80E-06	um02738	NO ANNOTATION AVAILABLE
2.265598	0.000443	um04353	N-ACETYLGLUCOSAMINYLTRANSFERASE (EC 2.4.1.-).
2.264282	6.47E-05	um04130	DIK6.
2.180734	1.39E-05	um06125	NO ANNOTATION AVAILABLE
2.13151	0.001117	um04949	NO ANNOTATION AVAILABLE
2.111938	0.000414	um01779	NO ANNOTATION AVAILABLE
2.106036	0.028998	um11886	NO ANNOTATION AVAILABLE
2.047423	0.032231	um00058	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.970162	0.00349	um03117	PIMK PROTEIN.
1.930751	0.000515	um02157	FAD dependent oxidoreductase, putative
1.925406	0.011134	um06190	ENDOCHITINASE.
1.913943	0.002666	um05528	CONSERVED HYPOTHETICAL PROTEIN.
1.903541	0.001156	um10000	IMMUNOREACTIVE 87KD ANTIGEN PG92.
1.899596	0.03896	um05104	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.878689	0.000382	um11505	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.872152	0.001696	um00303	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.871579	0.00012	um05046	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.819346	0.00697	um06459	CYTOCHROME P450 3A31 (EC 1.14.14.1) (CYP11A31) (P450 SH3A-1).
1.761909	0.001117	um00913	GLYOXAL OXIDASE PRECURSOR.
1.745935	5.18E-05	um05813	PUTATIVE TRANSMEMBRANE PROTEIN.
1.742195	0.006529	um02752	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.722767	0.002141	um00132	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.670817	0.011939	um03924	REPELLENT PROTEIN.
1.666095	0.037833	um01422	LIPASE B PRECURSOR (EC 3.1.1.3) (CALB).
1.612449	0.000356	um03795	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.607359	0.01243	um11057	PEPTIDE TRANSPORTER MTD1.
1.592764	0.001735	um04247	BILE-SALT-ACTIVATED LIPASE PRECURSOR (EC 3.1.1.3)



			(EC 3.1.1.13) (BAL) (BILE-SALT-STIMULATED LIPASE) (BSSL) (CARBOXYL ESTER LIPASE) (STEROL ESTERASE) (CHOLESTEROL ESTERASE) (PANCREATIC LYSOPHOSPHOLIPASE).
1.566137	4.41E-05	um03076	PUTATIVE 5 NUCLEOTIDASE FAMILY PROTEIN, POSSIBLY INVOLVED IN THE DEGRADATION OF EXTERNAL UDP-GLUCOSE BY SIMILARITY.
1.560368	0.018489	um10389	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.557974	0.015857	um01204	REPPRESSED BY TUP1 PROTEIN 4.
1.532376	0.017233	um04697	(U04436) putative polyketide synthase [Anabaena sp.]
1.527667	0.000296	um04027	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.514522	0.017688	um10636	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.49502	0.004744	um00132	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.488718	0.010703	um04181	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.434937	0.020778	um04357	BETA-1,6-GLUCANASE NEG1 (EC 3.2.1.75).
1.43141	0.04669	um05762	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.380807	0.048852	um11521	related to A/G-specific adenine DNA glycosylase
1.367902	0.003636	um05227	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.361748	0.003945	um01297	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.344319	0.007363	um06118	TRIPEPTIDYL-PEPTIDASE I PRECURSOR (EC 3.4.14.9) (TPP-I) (TRIPEPTIDYL AMINOPEPTIDASE) (LYSOSOMAL PEPSTATIN INSENSITIVE PROTEASE) (LPIC).
1.316456	0.000549	um01182	NUCLEAR AND CYTOPLASMIC POLYADENYLATED RNA-BINDING PROTEIN PUB1 (ARS CONSENSUS BINDING PROTEIN ACBP-60) (POLY(U)-BINDING PROTEIN) (POLY URIDYLATE-BINDING PROTEIN).
1.306355	0.029989	um10529	G1/S-SPECIFIC CYCLIN PCL1 (CYCLIN HCS26).
1.290228	0.037986	um02727	N,O-DIACETYLMURAMIDASE (EC 3.2.1.-) (LYSOZYME CH).
1.264726	0.000349	um04029	STEROL DESATURASE FAMILY PROTEIN.
1.247551	0.000101	um05809	(AY029595) putative beta-glucan synthesis-associated protein
1.229758	0.036446	um10888	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.217702	0.001431	um05633	PUTATIVE TRANSMEMBRANE PROTEIN.
1.170093	0.005289	um01117	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.162816	0.042733	um01788	DEACETYLASE PRECURSOR.
1.154457	0.001498	um11044	PEPTIDE-N4-(N-ACETYL-BETA-D-GLUCOSAMINYL) ASPARAGINASE AMIDASE N.
1.148088	0.000223	um04358	conserved hypothetical protein
1.147455	0.037968	um11155	HYPOTHETICAL 111.8 KDA PROTEIN.
1.133036	0.008546	um03615	CHOLINE DEHYDROGENASE (EC 1.1.99.1).
1.120593	0.036314	um01713	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.115308	0.0067	um04490	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.107075	0.010197	um04885	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.085447	0.035086	um00064	CATHEPSIN D PRECURSOR (EC 3.4.23.5).
1.08297	0.00225	um01855	PUTATIVE EXPORTED PROTEIN.
1.070813	0.0038	um01868	METABOLITE TRANSPORT PROTEIN.
1.060587	0.011965	um01073	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.053207	0.002797	um11427	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.051649	0.00137	um06454	MANNOSE-6-PHOSPHATE ISOMERASE (EC 5.3.1.8) (PHOSPHOMANNOSE ISOMERASE) (PMI) (PHOSPHOHEXOMUTASE).
1.041346	0.005253	um11357	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.036863	0.007486	um04076	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.027025	0.001749	um04999	EXTENSIN CLASS II PRECURSOR (CELL WALL HYDROXYPROLINE-RICH GLYCOPROTEIN) (HRGP) (TOML-4).
1.021307	0.000488	um02117	NO ANNOTATION AVAILABLE
1.020418	0.007414	um01042	FORKHEAD PROTEIN SEP1.
1.008536	0.045138	um10114	40S RIBOSOMAL PROTEIN S16.

-1.00189	0.043081	um10681	KETOL-ACID REDUCTOISOMERASE, MITOCHONDRIAL PRECURSOR (EC 1.1.1.86) (ACETOHYDROXY-ACID REDUCTOISOMERASE) (ALPHA-KETO-BETA-HYDROXYLACIL REDUCTOISOMERASE).
-1.00485	0.008011	um05130	PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE (EC 4.1.1.32).
-1.00607	0.006402	um01017	HYPOTHETICAL 102.7 KDA PROTEIN IN PRP16-SRP40 INTERGENIC REGION.
-1.00785	0.025245	um02683	HYPOTHETICAL 34.5 KDA PROTEIN (L-GALACTOSE DEHYDROGENASE) (AT4G33670/T16L1_160).
-1.01275	0.004507	um05459	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.02302	0.020216	um06406	PERIPHERAL-TYPE BENZODIAZEPINE RECEPTOR (PBR) (PKBS) (MITOCHONDRIAL BENZODIAZEPINE RECEPTOR).
-1.02465	0.023446	um04939	ARGINASE (EC 3.5.3.1).
-1.02761	0.011741	um10062	FLAVIN-CONTAINING MONOOXYGENASE 3 (EC 1.14.13.8).
-1.0406	0.039443	um04576	MOLECULAR CHAPERONE MRJ.
-1.04243	0.049701	um10003	HYDROPHOBIC PROTEIN RCI2A (LOW TEMPERATURE AND SALT RESPONSIVE PROTEIN LTI6A).
-1.06971	0.048331	um10240	GLUTARYL-COA DEHYDROGENASE, MITOCHONDRIAL PRECURSOR (EC 1.3.99.7) (GCD).
-1.07125	0.025038	um03824	SOR-LIKE PROTEIN.
-1.08676	0.001573	um03192	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.11872	0.043103	um01313	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.13365	0.001126	um01835	CARNITINE ACETYL TRANSFERASE FACC.
-1.14264	0.007974	um02197	HYPOTHETICAL TRANSMEMBRANE PROTEIN SMC02600.
-1.14559	0.040292	um04922	ALDO-KETO REDUCTASE FAMILY 1 MEMBER C4 (EC 1.1.1.-) (CHLORDECON REDUCTASE) (EC 1.1.1.225) (CDR) (3-ALPHA-HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE) (EC 1.1.1.50) (3-ALPHA-HSD) (DIHYDRODIOL DEHYDROGENASE 4) (DD4) (HAKRA).
-1.15476	0.012806	um05103	ATP SULPHURYLASE (EC 2.7.7.4).
-1.1835	0.01021	um01198	DEOXYRIBOSE-PHOSPHATE ALDOLASE (EC 4.1.2.4) (PHOSPHODEOXYRIBOALDOLASE) (DEOXYRIBOALDOLASE).
-1.19906	0.003033	um10815	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.20593	0.014277	um11345	S-ADENOSYLMETHIONINE-DEPENDENT METHYLTRANSFERASE.
-1.20633	0.00265	um10682	CYTOCHROME B2, MITOCHONDRIAL PRECURSOR (EC 1.1.2.3) (L-LACTATE DEHYDROGENASE [CYTOCHROME]) (L-LACTATE FERRICYTOCHROME C OXIDOREDUCTASE) (L-LCR).
-1.22478	0.027882	um04972	HIRA-INTERACTING PROTEIN 5 (MHIRIP5).
-1.23934	0.028015	um04500	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.24167	0.018911	um04873	3-ISOPROPYLMALATE DEHYDROGENASE (EC 1.1.1.85) (BETA-IPM DEHYDROGENASE) (IMDH) (3-IPM-DH).
-1.24687	0.018898	um11808	CHROMOSOME XII COSMID 8479.
-1.24896	0.008868	um04251	CG11679 PROTEIN (GM02445P).
-1.26364	0.002585	um03440	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.27692	0.010742	um02282	F6A14.17 PROTEIN (AT1G18720/F6A14_17).
-1.27742	0.024094	um06138	PEPTIDE TRANSPORTER PTR2 (PEPTIDE PERMEASE PTR2).
-1.2791	0.034477	um03929	HYPOTHETICAL 25.3 KDA PROTEIN IN TIM23-ARE2 INTERGENIC REGION.
-1.28038	0.016282	um01885	FATTY ACID SYNTHASE (EC 2.3.1.85) [INCLUDES: EC 2.3.1.38; EC 2.3.1.39; EC 2.3.1.41; EC 1.1.1.100; EC 4.2.1.61; EC 1.3.1.10; EC 3.1.2.14].
-1.28442	0.035853	um11172	VITAMIN H TRANSPORTER (H+/BIOTIN SYMPORTER).
-1.28911	0.001709	um03440	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.34421	0.001671	um05037	GLYOXYLATE REDUCTASE (EC 1.1.1.79) (GLYOXYLATE REDUCTASE/HYDROXYPYRUVATE REDUCTASE).
-1.39047	0.00486	um11921	related to metallothionein
-1.42706	0.016908	um04630	MUS81 ENDONUCLEASE.
-1.44489	0.007885	um04268	SACCHAROPINE DEHYDROGENASE [NAD+, L-LYSINE FORMING] (EC 1.5.1.7) (LYSINE--2-OXOGLUTARATE

			REDUCTASE) (SDH).
-1.44751	0.041014	um02300	AMYLASE (EC 3.2.1.-).
-1.47348	0.006257	um11919	MALOLACTIC ENZYME, MITOCHONDRIAL PRECURSOR (EC 1.-.-.-) (MLE) [INCLUDES: MALIC ENZYME (EC 1.1.1.-); L-LACTATE DEHYDROGENASE (EC 1.1.1.27)].
-1.47873	0.008471	um04189	BIFUNCTIONAL P-450:NADPH-P450 REDUCTASE PROTEIN (FATTY ACID OMEGA- HYDROXYLASE) (P450FOXY) [INCLUDES: CYTOCHROME P450 505 (EC 1.14.14.1); NADPH-CYTOCHROME P450 REDUCTASE (EC 1.6.2.4)].
-1.48345	0.0019	um02317	COPROPORPHYRINOGEN III OXIDASE (EC 1.3.3.3) (COPROPORPHYRINOGENASE) (COPROGEN OXIDASE) (COX).
-1.49886	0.019713	um00723	RELATED TO STRESS RESPONSE PROTEIN RDS1P.
-1.50128	0.001442	um02492	SYRINGOMYCIN BIOSYNTHESIS ENZYME-LIKE PROTEIN.
-1.52059	0.02441	um11895	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.52682	0.022931	um01951	RIBOSOMAL-PROTEIN-SERINE ACETYLTRANSFERASE (EC 2.3.1.-).
-1.53347	0.006431	um10657	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.53962	0.010959	um03006	ALDO/KETO REDUCTASE.
-1.54357	0.004647	um03177	PEROXISOMAL MEMBRANE PROTEIN PMP20.
-1.56828	0.022094	um11549	SUCRASE-LIKE PROTEIN.
-1.622	0.011615	um10242	NO ANNOTATION AVAILABLE
-1.66061	0.002288	um00158	POLYUNSATURATED FATTY ACID SPECIFIC ELONGATION ENZYME 1.
-1.80282	0.035641	um02774	ALTERNATIVE OXIDASE, MITOCHONDRIAL PRECURSOR (EC 1.-.-.-).
-1.81156	0.004192	um02171	PARASITIC PHASE-SPECIFIC PROTEIN PSP-1.
-1.8553	0.012996	um03995	ALPHA-KETOGLUTARATE-DEPENDENT TAURINE DIOXYGENASE (EC 1.14.11.17) (2-AMINOETHANESULFONATE DIOXYGENASE) (SULFATE STARVATION-INDUCED PROTEIN 3) (SSI3).
-1.89858	0.003548	um05204	PHOSPHATASE, ORPHAN 1.
-1.9154	0.047592	um10676	HYPOTHETICAL PROTEIN MA1996.
-1.9204	0.008463	um03023	RIBONUCLEASE T2 PRECURSOR (EC 3.1.27.1) (RNASE T2).
-2.04481	0.019195	um02190	NO ANNOTATION AVAILABLE
-2.06484	0.010839	um02865	NO ANNOTATION AVAILABLE
-2.0996	0.041456	um00573	K08H10.2A PROTEIN.
-2.15021	0.01877	um03881	HSP30.
-2.34835	0.021146	um05170	NAD-DEPENDENT FORMATE DEHYDROGENASE (EC 1.2.1.2).
-2.38223	0.017162	um00529	CARBOXYLIC ACID TRANSPORT PROTEIN.
-2.49755	0.013149	um12026	related to TMT1 - trans-aconitate methyltransferase (N-terminal fragment)
-2.64132	0.006363	um00496	MISMATCHED BASE PAIR AND CRUCIFORM DNA RECOGNITION PROTEIN (FRAGMENT).
-2.70861	0.004938	um10175	SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE LYASE (EC 4.1.2.27).
-3.2515	0.005567	um00336	NO ANNOTATION AVAILABLE
-3.71314	0.022842	um03169	ORNITHINE AMINOTRANSFERASE (EC 2.6.1.13).

# Danksagung

Mein Dank gilt zu allererst Prof. Dr. Regine Kahmann für das Überlassen dieses interessanten Themas ebenso wie für die großartige Unterstützung und die vielen Freiheiten in der Durchführung dieser Arbeit und vor allem während des Zusammenschreibens. Für alles, was ich unter ihrer Anleitung lernen durfte möchte ich hier noch einmal Danke sagen.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Graduiertenkolleg 1216 für meine Finanzierung und für alles, was ich im Rahmen dieses Programms lernen und erleben durfte. In diesem Zusammenhang gebührt mein Dank ebenfalls Prof. Dr. Maier und Frau Claudet für die tolle Organisation des Kollegs.

Den Mitgliedern meiner Prüfungskommission, Prof. Dr. Maier, Prof. Dr. Mösch, und Prof. Dr. Renkawitz-Pohl danke ich sehr für die freundliche Übernahme der Gutachten und ihre Mühen.

Nicht zuletzt möchte ich bei allen Mitarbeitern der AG Kahmann (und seit neuestem auch der AG Döhlemann) bedanken, ohne deren Mitwirken diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Die gute Atmosphäre und viele kurzweilige und auch lehrreiche Gespräche halfen vor allem, wenn die Arbeit beizeiten etwas stockte. Weiterhin möchte ich mich auch bei den anderen AGs in der Abteilung „Organismische Interaktionen“ für die tolle Zusammenarbeit und zahlreiche Diskussionen bedanken, die geholfen haben, diese Arbeit voran zu bringen. Ein Besonderer Dank gebührt Gunther Döhlemann für seine Hilfe bei konfokaler Mikroskopie und den Microarray-Analysen. Thomas Brefort danke ich für seine Einweisung in den Modellorganismus *Ustilago maydis*.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich Gunther Döhlemann, Daniel Lanver und Kerstin Schipper.

Auch für so manche schöne Stunde auch abseits der Arbeit möchte ich mich Gunther Döhlemann, Armin Djamei, Alex Hof, Daniel Lanver, Karina van der Linde, Holger Reis, Familie Reissmann, Kerstin Schipper, Steffi Treitschke und Alex Zahiri bedanken. Danke für eure Freundschaft, eure hohe Motivation und Einsatzbereitschaft bei Grillabenden, dem Schlucke-Quiz, geselligem Beisammensein in Karinas Küche, hartem Training und unzähligen Fußballabenden.

Zu guter letzt möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere meinen Eltern bedanken, die mich während meines Studiums und dieser Arbeit unterstützt und mir Halt und ein Zuhause gegeben haben. Danke Nadine für deine Unterstützung, deine Liebe, für Zuspruch, Ansporn und Inspiration.

# Lebenslauf

**Patrick Berndt**

## Persönliche Angaben

---

- Geburtsdatum: 15 November 1977
- Geburtsort: Altenkirchen (Westerwald)

## Werdegang

---

- 03.2006 – 05.2009 Philipps Universität Marburg/ Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie  
*Dissertation im Fachbereich Genetik*
- Titel der Forschungsarbeit: „Identifizierung und Charakterisierung von Pflanzensignalen die zur Differenzierung von *Ustilago maydis* führen“
- Gefördert durch ein Stipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Graduiertenkollegs 1216
- 09.2005 – 02.2006 Universität des Saarlandes  
*Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Fachbereich Pharmazeutische Biologie*
- Themengebiet der Arbeit: „Interaktion der  $\alpha$ -Liponsäure mit anti-inflammatorischen Signaltransduktionswegen im Endothel“
- 10.1998 – 08.2005 Technische Universität Kaiserslautern  
*Diplom-Biologe, Diplom im Fachbereich Phytopathologie*
- Diplomarbeit „Physiologische und molekulare Untersuchungen zur Regulation der Keimung des Grauschimmelerregers *Botrytis cinerea*“
- 09.1988 – 06.1997 Zivildienst im Evangelischen und Johanniter Krankenhaus Dierdorf
- 09.1988 – 06.1997 Martin Butzer Gymnasium Dierdorf  
*Allgemeine Hochschulreife*
- Hauptfächer in Biologie, Englisch und Sozialkunde
- 09.1984 – 07.1988 Grundschule Dierdorf

